

Patricia Ruiz Pérez

**BIODIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA
LÁCTICA PRESENTE EN LA FERMENTACIÓN
MALOLÁCTICA DE VINOS TINTOS DE LA
VARIEDAD CENCIBEL: CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR Y TECNOLÓGICA PARA LA
SELECCIÓN DE CEPAS**

I.S.B.N. Ediciones de la UCLM
978-84-8427-795-8



Ediciones de la Universidad
de Castilla-La Mancha

Cuenca, 2010



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA
Facultad de Ciencias del Medio Ambiente
Departamento de Química Analítica y Tecnología de los
Alimentos

**BIODIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA LÁCTICA
PRESENTE EN LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA
DE VINOS TINTOS DE LA VARIEDAD CENCIBEL:
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y TECNOLÓGICA
PARA LA SELECCIÓN DE CEPAS**

Patricia Ruiz Pérez

**TESIS DOCTORAL
Toledo, 2010**



Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos

**Biodiversidad de la microbiota láctica presente en la
fermentación maloláctica de vinos tintos de la variedad
Cencibel: Caracterización molecular y tecnológica para la
selección de cepas**

por

Patricia Ruiz Pérez

Visado en Toledo, 14 de Diciembre de 2009

Fdo.: M^a de los Llanos Palop Herreros
Profesora Titular del
Departamento de Química Analítica
y Tecnología de Alimentos de la
Universidad de Castilla-La Mancha

Trabajo presentado para optar al Grado
de Doctor por la Universidad de Castilla-
La Mancha

Fdo.: Patricia Ruiz Pérez
Licenciada en Ciencias del Medio
Ambiente



ANTONIA GARCÍA RUIZ, Profesora Titular de Universidad y Secretaria del Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Castilla-La Mancha

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado “Biodiversidad de la microbiota láctica presente en la fermentación maloláctica de vinos tintos de la variedad Cencibel: Caracterización molecular y tecnológica para la selección de cepas” constituye la Tesis Doctoral que presenta **D^a. Patricia Ruiz Pérez** para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Castilla-La Mancha, y ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento bajo la dirección de la **Dra. D^a. M^a de los Llanos Palop Herreros**.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Ciudad Real a catorce de diciembre de dos mil nueve.

Vº Bº

Fdo: José Antonio Murillo Pulgarín
Director del Departamento

Fdo: Antonia García Ruiz
Secretaria del Departamento

*A mis padres,
a mis hermanos y
a Ángel*

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han acompañado durante todo este tiempo y que, de alguna manera, me han dado ánimos para realizar esta Tesis Doctoral.

Especialmente, a la Dra. M^a de los Llanos Palop Herreros, Directora de esta Tesis Doctoral, por darme la oportunidad de realizarla, por su dedicación a este trabajo, por su constante apoyo y por su comprensión en todo momento. Gracias por confiar en mis posibilidades y retarme a esforzarme más cada día.

A la Dra. Susana Seseña por su enorme disponibilidad, por su continua ayuda, por su apoyo y sus ánimos, por su simpatía y amistad y por estar siempre ahí. Muchas gracias por todo.

A las Dras. Carmen Arribas y Araceli del Arco, profesoras titulares del Departamento de Bioquímica, por su gran disponibilidad y por compartir sus conocimientos conmigo.

A mis compañeras de laboratorio, Isabel, Elena, Leticia y Fátima por su ayuda y por el interés en que todo saliese bien.

Al grupo de investigadores del Instituto de la Vid y del Vino de Castilla-La Mancha, especialmente a los Dres. Esteban García y Pedro Miguel Izquierdo, por haber compartido sus conocimientos enológicos con nosotras y por su constante implicación en este trabajo.

A la empresa Lallemand S.A. por su inestimable ayuda en la realización de algunos de los ensayos realizados en esta Tesis.

También quiero agradecer la colaboración y el buen trato recibido de las bodegas Dehesa del Carrizal, Bodegas Illana, Bodegas La Cerca, Bodegas Lozano, Bodegas y Viñedos Muñoz, Cooperativa Virgen de las Viñas, Cooperativa El Progreso, Finca Marisánchez, S.A.T. Videma y Viñedos y Bodegas González, que además de suministrarnos las muestras de vino, siempre manifestaron su interés por colaborar en nuestras investigaciones y por los resultados que en las mismas se obtuvieran.

Igualmente, agradezco la financiación y los medios aportados por la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha y por el Ministerio de Educación y Ciencia.

A todos los compañeros de la Facultad de Ciencias del Medio Ambiente por las interesantes experiencias que hemos compartido. Perdonadme por no mencionaros uno a uno pero es que hemos sido muchos los que hemos pasado por el “Sabatini”. Nunca olvidaré los entretenidos cafés hablando de muy diversas situaciones profesionales y personales.

A mis amigos, en especial a Virginia y Gabriel, por todos los buenos e inolvidables momentos vividos durante este tiempo y porque la verdadera amistad perdure siempre. Os deseo todo lo mejor para la “nueva vida” que empezáis el 5 de junio de 2010.

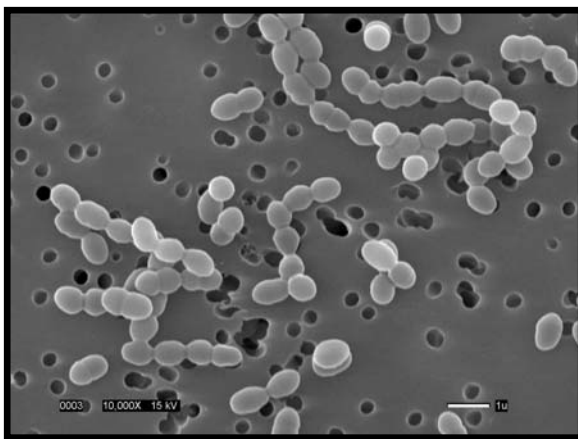
A la memoria de mis abuelos, a quienes les hubiera gustado compartir estos instantes de felicidad.

A mi familia por aceptarme “tal y como soy” y hacerme sentir bien siempre. En especial a mis padres, Pepe y Ángela, porque gracias a ellos soy quien soy, por su ayuda durante todos estos años, por su comprensión y su cariño. A mis hermanos, Jose y Esther, por todos los divertidos momentos que hemos pasado juntos.

A mi segunda familia, incluidas las “peques” Carla y Alejandra, por considerarme “uno más” y por el cariño demostrado durante todo este tiempo.

A Lara, quien espero que algún día sea una más de la familia, aunque yo considero que ya lo es. Gracias por todas las experiencias compartidas.

*Por último, quiero agradecer de forma especial el apoyo incondicional de Ángel: por su amistad y su cariño, por su comprensión y sabios consejos, por su ayuda y constante apoyo, por todas las inolvidables vivencias que hemos compartido y por quererme como soy. **GRACIAS POR TODO.***



Leuconostoc

Índice

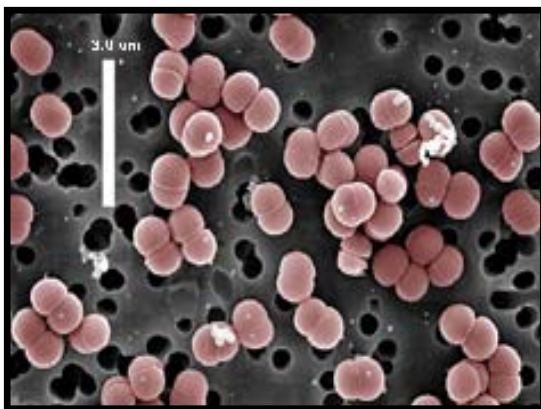


ÍNDICE

| | |
|--|----------|
| 1. INTRODUCCIÓN GENERAL..... | 1 |
| 1.1. LA FERMENTACIÓN..... | 3 |
| 1.1.1. SIGNIFICADO Y ORÍGENES..... | 3 |
| 1.1.2. TIPOS DE FERMENTACIÓN..... | 5 |
| 1.2. LAS BACTERIAS LÁCTICAS..... | 9 |
| 1.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y DE CULTIVO..... | 9 |
| 1.2.2. TAXONOMÍA..... | 11 |
| 1.2.3. METABOLISMO..... | 15 |
| 1.2.3.1. Metabolismo de los azúcares..... | 15 |
| 1.2.3.2. Metabolismo de los ácidos orgánicos..... | 20 |
| 1.2.3.3. Metabolismo de los compuestos nitrogenados..... | 21 |
| 1.2.3.4. Otras transformaciones bioquímicas..... | 25 |
| 1.2.3.5. Otros aspectos del metabolismo..... | 26 |
| 1.2.4. IDENTIFICACIÓN Y GENOTIPADO DE BACTERIAS LÁCTICAS..... | 28 |
| 1.2.4.1. Métodos fenotípicos..... | 29 |
| 1.2.4.2. Métodos físico-químicos..... | 31 |
| 1.2.4.3. Métodos moleculares..... | 34 |
| 1.2.5. APLICACIONES DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS..... | 45 |
| 1.3. LA VINIFICACIÓN..... | 48 |
| 1.3.1. LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA..... | 49 |
| 1.3.2. LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA..... | 50 |
| 1.3.2.1. Bioquímica del proceso..... | 50 |
| 1.3.2.2. Microbiología del proceso..... | 53 |
| 1.3.2.3. Ecología del proceso..... | 56 |

| | |
|--|-----------|
| 1.3.2.4. Factores que influyen en el crecimiento de las bacterias lácticas en el vino..... | 59 |
| 1.3.2.5. Desarrollo y control de la fermentación maloláctica..... | 61 |
| 1.3.2.6. Efectos de la fermentación maloláctica en el vino..... | 62 |
| 1.3.2.7. Mecanismos de inducción de la fermentación maloláctica..... | 64 |
| 1.4. EL SECTOR VITIVINÍCOLA EN ESPAÑA..... | 68 |
| 1.5. LA VARIEDAD TEMPRANILLO..... | 70 |
| 1.5.1. VÍNCULO CON EL MEDIO..... | 71 |
| 1.5.1.1. Historia..... | 71 |
| 1.5.1.2. Extensión..... | 72 |
| 1.5.2. CARACTERÍSTICAS DE LA UVA TEMPRANILLO..... | 73 |
| 1.5.3. LOS VINOS DE LA VARIEDAD TEMPRANILLO..... | 75 |
| 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO..... | 77 |
| 3. RESULTADOS..... | 83 |
| 3.1. RELACIÓN DE PUBLICACIONES..... | 85 |
| 3.1.1. Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. <i>Food Microbiol.</i> 25, 942-948..... | 87 |
| 3.1.2. Ecological study of lactic acid microbiota isolated from Tempranillo wines of Castilla-La Mancha. <i>J. Biosci. Bioeng.</i> 108, 220-224..... | 97 |

| | |
|---|------------|
| 3.1.3. Analysis of lactic acid bacteria populations during spontaneous malolactic fermentation of Tempranillo wines at five wineries during two consecutive vintages. <i>Food Control</i> 21, 70-75..... | 105 |
| 3.1.4. Selection of autochthonous <i>Oenococcus oeni</i> strains according to their oenological properties and vinification results. <i>Int. J. Food Microbiol.</i> doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.027..... | 113 |
| 3.1.5. Biogenic amine production by <i>Oenococcus oeni</i> isolates from malolactic fermentation of Tempranillo wine. <i>J. Food Protect.</i> 72, 907-910..... | 121 |
| 3.1.6. Colonizing ability of a selected autochthonous strain of <i>Oenococcus oeni</i> (En preparación)..... | 127 |
| 3.1.7. Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a culture-independent method (PCR-DGGE). <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> (En revisión)..... | 147 |
| 3.1.8. Producción de acidez volátil y degradación de ácido cítrico por cepas de <i>Oenococcus oeni</i> aisladas de la fermentación maloláctica espontánea de vinos Cencibel elaborados en Castilla-La Mancha. <i>Vitic. Enol. Prof.</i> 111, 37-42..... | 165 |
| 4. DISCUSIÓN GENERAL..... | 173 |
| 5. CONCLUSIONES FINALES..... | 189 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA..... | 195 |



Pediococcus

1. Introducción general

1.1. LA FERMENTACIÓN

1.1.1. SIGNIFICADO Y ORÍGENES

El término “fermentación” ha sufrido numerosos cambios en su significado a lo largo del tiempo, tanto en el lenguaje coloquial como en el científico. Inicialmente, este término se utilizó para describir procesos de descomposición de la materia orgánica en los que se observaba un rápido y tumultuoso desprendimiento de gas. No en vano esta palabra tiene su raíz en el verbo hebraico *fervere*, que significa hervir.

Pasteur utilizó este término para describir procesos microbianos que se desarrollaban en condiciones anaerobias como el que llevan a cabo las levaduras cuando crecen sobre un sustrato azucarado, y en los que se producía la formación masiva de CO₂. Contemporáneos suyos lo utilizaron para describir procesos microbianos exotérmicos o procesos de elaboración de productos agrícolas.

Actualmente, y en su sentido más amplio, el término fermentación se utiliza para definir un proceso en el que un sustrato se transforma en un producto o productos por la acción de los microorganismos. La Real Academia Española define la fermentación como “un proceso de cambio con efervescencia”, “un estado de agitación o de inquietud”, o “cualquiera de las diversas transformaciones de las sustancias orgánicas”.

No obstante, su significado puede variar dependiendo del contexto en el que se utilice y así, desde el punto de vista bioquímico, el término “fermentación” se refiere al mecanismo de obtención de energía a través del catabolismo de compuestos orgánicos, ocurrido en ausencia de O₂, mientras que en Microbiología Industrial, se trata de un concepto mucho más amplio y se aplica a los procesos que emplean microorganismos para obtener un determinado producto.

De las anteriores definiciones se desprende que para que una fermentación tenga lugar se necesita de la presencia de un sustrato, unos microorganismos y unas condiciones físicas adecuadas. Suárez (2008) indica que de forma general se puede establecer que:

- Las fermentaciones son reacciones en cadena catalizadas por enzimas de origen microbiano.

- Las secreciones enzimáticas de las distintas especies microbianas participantes presentan una notable diversidad cualitativa y cuantitativa, incluso entre las distintas cepas, variedades o razas de una misma especie.

- Los agentes físico-químicos influyen notablemente en la producción y funcionalidad de los enzimas microbianos. Por lo tanto, el curso y resultado final de cada fermentación puede ser diferente dependiendo de las peculiares características fisiológicas de los microorganismos implicados y de las condiciones ambientales en que se realice.

Aplicada a los alimentos, la fermentación es una técnica de conservación utilizada desde antiguo, que permite obtener productos con características físicas, químicas y organolépticas totalmente distintas de las de la materia prima de la que proceden. Existen referencias que indican que en muchas civilizaciones antiguas se consumían alimentos obtenidos por fermentación como el vino, la cerveza, las leches fermentadas, el pan o los encurtidos. Con el paso del tiempo, cada país ha desarrollado su propia tradición en la preparación y producción de alimentos fermentados y como muestra de ello cabe mencionar que mientras los países orientales prefieren el uso de los mohos para la elaboración de una gran variedad de leches fermentadas, en los occidentales es más frecuente el uso de bacterias y de levaduras (Buckenhüskes, 1990 y 1993).

La fermentación aporta a los alimentos interesantes beneficios (Bourgeois y Larpent ,1989; Giraffa, 2004), así por ejemplo:

- Mejora la calidad sensorial y las características organolépticas en general, al modificar la textura y el aroma de los mismos.

- Incrementa el valor nutritivo, ya que los microorganismos pueden sintetizar vitaminas, aminoácidos esenciales y proteínas y degradar factores antinutricionales.

- Aumenta la seguridad, al reducir la presencia de compuestos tóxicos como las aflatoxinas y/o los compuestos cianogénicos.

- Proporciona estabilidad, puesto que los compuestos antimicrobianos producidos inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos, lo que hace aumentar la vida útil de los alimentos.

Finalmente, hay que señalar que la fermentación, aplicada como método de conservación de los alimentos, es además un proceso energéticamente rentable ya que requiere menor consumo energético que otros métodos de conservación.

1.1.2. TIPOS DE FERMENTACIÓN

Las transformaciones de los alimentos por fermentación tienen como principal sustrato los carbohidratos y son fundamentalmente de tres tipos: la **fermentación láctica**, que llevan a cabo las bacterias lácticas, la **fermentación alcohólica**, en la que participan las levaduras, y la **fermentación acética**, que realizan las bacterias acéticas, obteniéndose en cada una de ellas distintos productos finales. Así, mientras en la fermentación alcohólica se produce etanol como producto mayoritario, en la fermentación acética se produce la oxidación del etanol a ácido acético. Por su parte, en la fermentación láctica se produce ácido láctico como producto único o mayoritario. En ésta, podemos además distinguir la denominada fermentación homofermentativa u homoláctica, que es aquella en la que a partir de una molécula de glucosa se producen dos moléculas de ácido láctico, y la heterofermentativa o heteroláctica en la que además de una molécula de ácido láctico se obtienen entre otros productos, etanol, ácido acético y CO₂.

La conservación de los alimentos por fermentación láctica, aunque en el mundo occidental tiene un papel secundario con respecto a otras técnicas más novedosas, como el tratamiento térmico, la congelación o la deshidratación, continúa siendo un método muy utilizado para la conservación de algunos alimentos, como los vegetales o los productos cárnicos, y como sistema de obtención de una gran variedad de productos lácteos.

Otras fermentaciones posibles, aunque en ocasiones indeseables, son las que se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Fermentaciones bacterianas que transcurren a través de la ruta glucolítica.

| Fermentación | Productos principales del ácido pirúvico | Microorganismo responsable |
|---------------------|--|-----------------------------------|
| Ácido-mixta | Ácido láctico Ácido acético Ácido succínico Ácido fórmico (o CO ₂ y H ₂) Etanol | <i>Escherichia</i> |
| Butanodiólica | Idem anterior 2,3-Butanodiol | <i>Enterobacter</i> |
| Butírica | Ácido butírico Ácido acético CO ₂ y H ₂ | <i>Clostridium</i> |
| Acetona-butanólica | Idem anterior Butanol Etanol Acetona Isopropanol | <i>Clostridium</i> |
| Propiónica | Ácido propiónico Ácido acético CO ₂ | <i>Propionibacterium</i> |

Las rutas metabólicas para la fermentación de la glucosa utilizadas por estos microorganismos y sus correspondientes productos finales, se muestran de forma esquemática en la Figura 1.

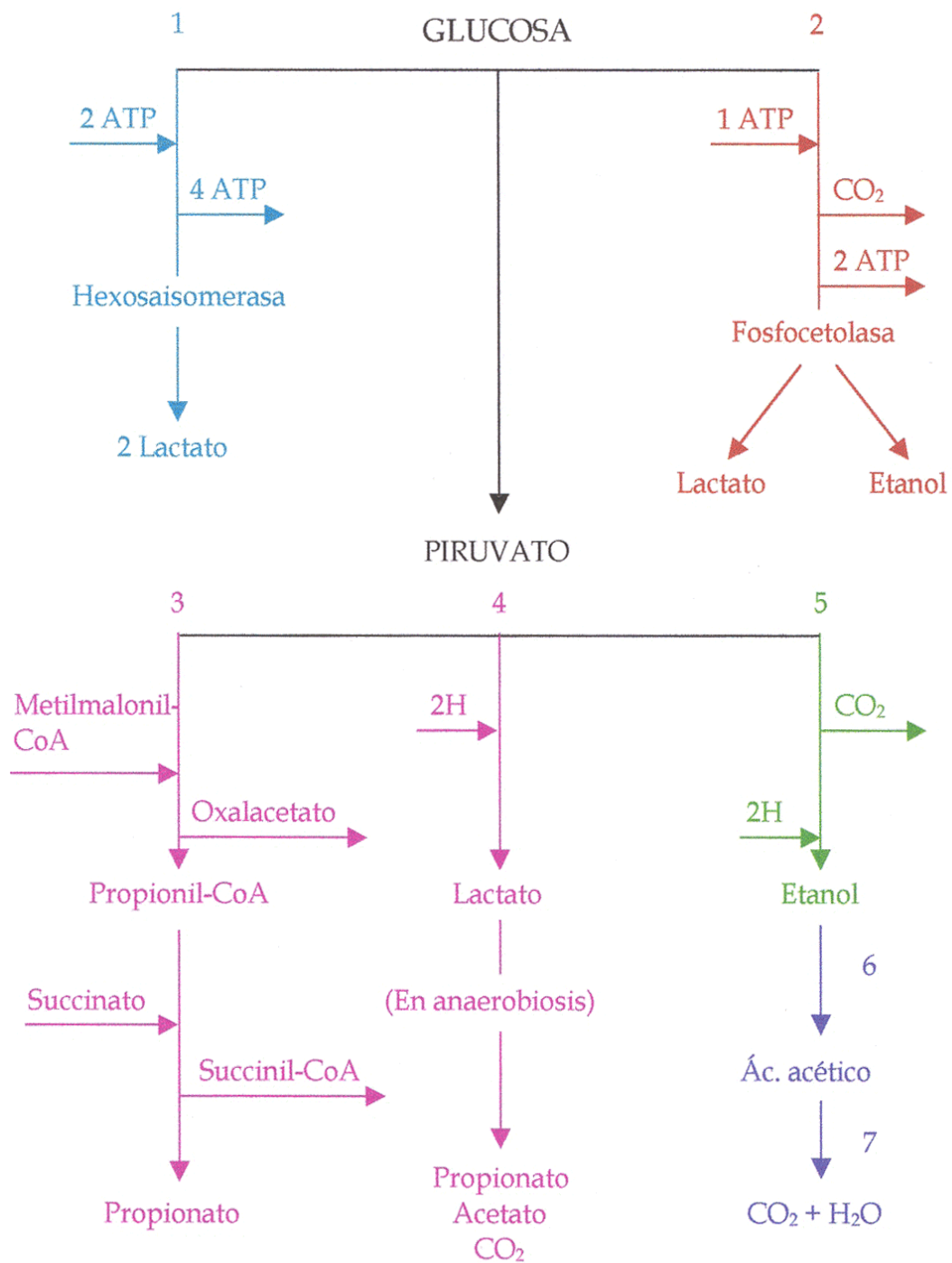


Figura 1. Vías metabólicas para la fermentación de la glucosa utilizadas por algunos microorganismos. 1: Bacterias lácticas homofermentativas; 2: Bacterias lácticas heterofermentativas; 3 y 4: *Propionibacterium*; 5: *Saccharomyces* spp. 6: *Acetobacter* spp.; 7: Cepas de *Acetobacter* "superoxidantes".

1.2. LAS BACTERIAS LÁCTICAS

1.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y DE CULTIVO

Desde la antigüedad (3200 a.C.) existen referencias de la existencia de leches fermentadas, si bien la primera descripción de la participación de las bacterias en éstas y otras fermentaciones tiene lugar en el año 1857 y es producida por Louis Pasteur, quien también describió el papel de las levaduras en la fermentación alcohólica y el de las bacterias en el agriado del vino y de la cerveza.

Años más tarde Lister aísla y purifica una bacteria que denomina “*Bacterium lactis*” (actual *Lactococcus lactis*) a partir de leche ácida y en 1890, los científicos, Weigmann y Storch introducen, casi simultáneamente en Dinamarca y Alemania respectivamente, el uso de bacterias como cultivos iniciadores para la fermentación de la leche.

Tradicionalmente bajo la denominación de “bacterias lácticas”, se ha incluido a un grupo con una gran diversidad morfológica y fisiológica, cuya característica principal es la de ser capaces de producir ácido láctico como metabolito único o mayoritario de la fermentación de los hidratos de carbono (Orla-Jensen, 1919; Sharpe, 1979). Kandler y Weiss en 1986 las definen como “bacterias Gram positivas, no esporuladas, catalasa negativo, inmóviles, de morfología celular cocoide o bacilar, con la característica principal de ser estrictamente fermentativas y producir como compuesto final de dicha fermentación ácido láctico, como producto único o mayoritario. Son microaerófilas o anaerobias facultativas, incapaces de sintetizar citocromos, acidúricas o acidófilas y no reductoras de los nitratos”. Poseen además una gran especificidad fisiológica y sus requerimientos nutricionales son complejos, motivo por el que en la naturaleza se encuentran asociadas a hábitats ricos en nutrientes, como algunos alimentos, vino, leche, carnes y vegetales, la boca, el intestino, la vagina, etc., en los que son consideradas “inquilinos” habituales.

El cultivo de las bacterias lácticas en el laboratorio requiere de medios complejos que contengan diversos factores de crecimiento, como vitaminas del grupo B, aminoácidos, péptidos y bases púricas y pirimidínicas, que resultarán por ello poco selectivos. Además, estos medios deben incorporar moléculas

capaces de liberar la energía necesaria para el metabolismo de estas bacterias (Ribérerau-Gayon et al., 2003) y, dado que se trata de organismos quimiorganotrofos, lo más habitual es encontrar en su formulación azúcares, a partir de cuya oxidación obtendrán energía. Los medios más utilizados son el MRS (Man et al., 1960), el agar Rogosa (Rogosa et al., 1951), el MLO (medio para *Leuconostoc oeni*) o el agar sangre.

Dejando de lado el agua, que es el constituyente celular más importante, las bacterias lácticas han de obtener del medio el carbono, el nitrógeno y los elementos minerales que entran en la composición de los constituyentes celulares. El carbono proviene esencialmente de los azúcares (hexosas y pentosas) y eventualmente de los ácidos orgánicos (ácido málico y ácido cítrico), mientras que el nitrógeno es aportado por los aminoácidos y eventualmente por los péptidos. Los elementos minerales, como los cationes Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ y Na^+ , son también necesarios, actuando algunos de ellos como cofactores de enzimas claves en el metabolismo como las kinasas o la enzima maloláctica.

Con respecto a las condiciones óptimas para su crecimiento hay que indicar que, aunque toleran bien los pHs ácidos, a medida que el medio se va acidificando como consecuencia de su crecimiento, disminuye el número de especies que son capaces de sobrevivir. La mayoría crecen e incluso prefieren pHs comprendidos en el intervalo entre 4,0 y 4,5, aunque puede encontrarse algún género o especie capaz de crecer a pH 3,9, como *Lactobacillus* (L.) *plantarum* o *L. brevis* (Samelis et al., 1994) y otros que lo hacen a pHs comprendidos entre 9,2 y 9,6 como las especies *Streptococcus* (S.) *lactis* y *S. thermophilus* o aquellas del género *Carnobacterium* (Larpen, 1995; Axelsson, 1998).

En cuanto a la temperatura óptima de crecimiento, pueden establecerse dos grupos de especies:

- Especies mesófilas, cuya temperatura óptima está comprendida en el intervalo de 22 a 34 °C. En éste se incluyen la mayoría de las especies de todos los géneros.

- Especies termófilas, con una temperatura óptima entre los 37 °C y los 45 °C. En éste se incluyen algunas especies del género *Lactobacillus*, como *L. bavaricus*, que se utiliza en la fabricación del yogurt, y algunas del género *Streptococcus* como *S. thermophilus*.

Por último, en lo que a la tolerancia al oxígeno se refiere, es interesante indicar que, aunque por definición son especies microaerófilas, es decir sólo van a crecer bien con bajas presiones parciales de oxígeno, son generalmente aerotolerantes y la mayoría crecen mejor en atmósferas que contengan entre un 5 y un 10% de CO₂. Sólo algunas especies que se encuentran en el intestino de los animales, como *L. ruminis* y *L. vitulinus*, son anaerobias estrictas (Kandler y Weiss, 1986).

1.2.2. TAXONOMÍA

Los primeros intentos de clasificación de las bacterias lácticas se deben a Orla-Jensen (1919) quien, basándose en la morfología y la disposición celular y en criterios fisiológicos tales como, el tipo de metabolismo fermentativo de la glucosa, el tipo de isómero del ácido láctico producido y la capacidad para desarrollarse a 10 °C y a 45 °C, incluyó a aquellas de morfología bacilar en los géneros: *Betabacterium*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium* y *Microbacterium*, y a las de morfología cocoide en los géneros: *Streptococcus*, *Betacoccus* y *Tetracoccus*.

Esta primera clasificación ha sufrido diversas modificaciones con el paso de los años. Así, en la edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* del año 1986, las bacterias con las características descritas por Kandler y Weiss (1986) aparecen incluidas en los géneros *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus* y *Gemella*, distribuyéndose las especies del género *Lactobacillus* en tres grupos dependiendo de si poseían o no las enzimas fructosa-1,6-difosfato aldolasa y fosfoacetolasa, enzimas claves del metabolismo homo y heterofermentativo. El grupo I comprendía a los lactobacilos homofermentadores obligados, poseedores de la enzima fructosa-1,6-difosfato aldolasa pero no la fosfoacetolasa, el grupo II comprendía a los lactobacilos heterofermentadores

facultativos y el grupo III comprendía a los lactobacilos heterofermentadores obligados que, por el contrario, poseen la enzima fosfocetolasa pero no la fructosa-1,6-difosfato aldolasa.

Años más tarde y como consecuencia de la aplicación de técnicas bioquímicas y moleculares avanzadas se produjeron importantes cambios en la taxonomía de las bacterias lácticas, la mayoría de los cuales aparecen por primera vez reflejados en la 9ª edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994). Así por ejemplo, el género *Streptococcus* aparece desdoblado en otros tres géneros filogenéticamente distintos, *Streptococcus sensu stricto*, *Enterococcus* y *Lactococcus*. Los estreptococos móviles, incluidos anteriormente en el género *Lactococcus*, aparecen incluidos en el género *Vagococcus* (Collins et al., 1989), de igual forma que algunas especies del género *Lactobacillus*, aparecen incluidas en el género *Carnobacterium* (Collins et al., 1987). La especie *Pediococcus halophilus* se incluyó en el género denominado *Tetragenococcus* (Collins et al., 1990).

Posteriormente, el análisis de las secuencias de los fragmentos 16S y 23S del ARNr (Stiles y Holzapfel, 1997), que permiten conocer las relaciones filogenéticas entre los microorganismos, ha permitido nuevas clasificaciones y así, los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* han sido reclasificados en tres grandes grupos: el grupo *Leuconostoc*, el grupo *Lactobacillus delbrueckii* y el grupo *Lactobacillus casei-Pediococcus* (Scheifer et al., 1995; Vandamme et al., 1996). Por otra parte los géneros *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus* han sido relacionados filogenéticamente con el género *Enterococcus* (Scheifer et al., 1995).

Muy recientemente (Endo y Okada, 2008) se ha realizado un estudio taxonómico de las especies del género *Leuconostoc* basado en el análisis de las secuencias del ARNr 16S, estableciéndose tres subgrupos para las mismas: el subgrupo *Leuconostoc (Ln.) mesenteroides* que comprende las especies *Ln. carnosum*, *Ln. citreum*, *Ln. gasicomitatum*, *Ln. gelidum*, *Ln. inhae*, *Ln. kimchii*, *Ln. lactis*, *Ln. mesenteroides* y *Ln. pseudomesenteroides*, el subgrupo *Ln. fructosum* que comprende las especies *Ln. durionis*, *Ln. ficulneum*, *Ln. fructosum* y *Ln. pseudoficulneum* y el subgrupo *Ln. fallax* que

comprende únicamente la especie *Ln. fallax*. Estos mismos autores proponen además que las cuatro especies del subgrupo *Ln. fructosum* formen parte de un nuevo género, el género *Fructobacillus*, denominándose *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. *Fructobacillus fructosus* comb. nov. y *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov.

En la actualidad, y entretanto son aceptadas estas modificaciones, está establecido que el grupo de las bacterias lácticas está constituido por los géneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Weissella* y *Tetragenococcus*.

La Tabla 2 muestra las principales características fenotípicas diferenciales de estos géneros (Axelsson, 1998).

Tabla 2. Características fenotípicas de las bacterias

| Característica | Bacilos | | Cocos | | | | | | | |
|---|-----------------|-----------------------|--------|----------|----------------|----------------|--------------------|-----------|-------------|------------------------|
| | Carnob. | Lactob. | Aeroc. | Enteroc. | Lactoc. Vagoc. | Leucon. Oenoc. | Pedioc. | Streptoc. | Tetragenoc. | Weissella ^b |
| Formación de tétradas | - | - | + | - | - | - | + | - | + | - |
| CO ₂ a partir de la glucosa ^c | - ^e | ± | - | - | - | + | - | - | - | + |
| Crecimiento a 10 °C | + | ± | + | + | + | + | ± | - | + | + |
| Crecimiento a 45 °C | - | ± | - | + | - | - | ± | ± | - | - |
| Crecimiento con 6,5% NaCl | ND ^f | ± | + | + | - | ± | ± | - | + | ± |
| Crecimiento con 18% NaCl | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| Crecimiento a pH 4,4 | ND | ± | - | + | ± | ± | + | - | - | ± |
| Crecimiento a pH 9,6 | - | - | + | + | - | - | - | - | + | - |
| Ácido láctico ^d | L | D, L, DL ^g | L | L | L | D | L, DL ^g | L | L | D, DL ^g |

^a+, positivo; -, negativo; ±, respuesta variable según especies; ND, no determinada.

^bWeissella también puede tener forma bacilar.

^cHomo o heterofermentación de la glucosa: negativo y positivo indican homofermentación y heterofermentación, respectivamente.

^dConfiguración del ácido láctico producido a partir de la glucosa.

^ePequeñas cantidades de CO₂ pueden ser producidas, dependiendo del medio.

^fCrecimiento negativo en 8% de NaCl.

^gProducción de los isómeros D-, L- o DL- del ácido láctico.

1.2.3. METABOLISMO

El metabolismo representa el conjunto de reacciones bioquímicas llevadas a cabo por la célula durante su crecimiento. Consta de dos tipos de reacciones, las reacciones catabólicas que aseguran las transformaciones energéticas de los sustratos asimilables del medio o presentes como sustratos de reserva en la célula, y las reacciones anabólicas que garantizan la síntesis de compuestos celulares a partir de sustratos del medio y de intermediarios del catabolismo (Ribéreau-Gayon et al., 2003).

Las bacterias lácticas tienen un metabolismo complejo y diverso lo que les permite adaptarse a situaciones cambiantes, aunque las condiciones de cultivo impuestas cuando se trabaja con ellas en el laboratorio limitan sin duda sus posibilidades (Axelsson, 1998).

Como se ha indicado anteriormente, la característica esencial del metabolismo de las bacterias lácticas es la producción de ácido láctico como principal metabolito de la fermentación de los carbohidratos, si bien dependiendo del sustrato disponible pueden producir otros compuestos.

Por su interés para nuestro estudio describiremos el metabolismo de los azúcares, el de los ácidos orgánicos, el de los compuestos nitrogenados y el de algunos otros compuestos de importancia en enología.

1.2.3.1. Metabolismo de los azúcares

Las bacterias lácticas tienen una gran capacidad para degradar diferentes carbohidratos y otros compuestos relacionados, siendo los azúcares el mejor sustrato para su crecimiento.

La Figura 2 muestra un esquema de las rutas metabólicas comúnmente utilizadas para la fermentación de estos compuestos, si bien las dos más importantes son:

A) **Glucolisis o vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)** (A en la Figura 2). Es la ruta a través de la cual las especies denominadas **homofermentadoras** u **homolácticas**, en condiciones de crecimiento estándar

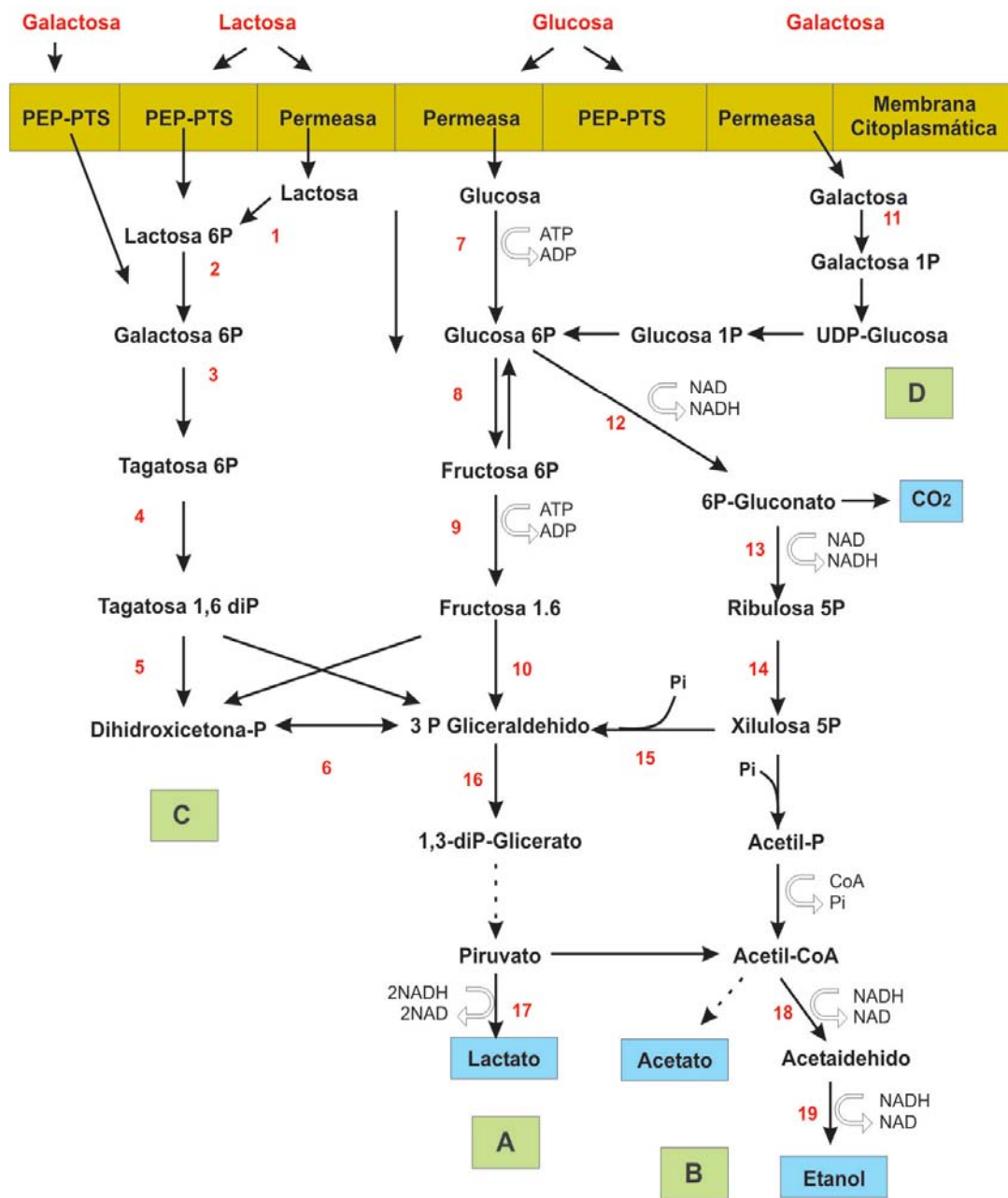


Figura 2. Principales rutas de transporte y metabolismo de azúcares utilizadas por las bacterias lácticas. (A) Fermentación homoláctica (glucólisis o vía de Embden-Meyerhof-Parnas); (B) Fermentación heteroláctica (ruta del 6 fosfogluconato/fosfocetolasa); (C) Ruta de la tagatosa-6-fosfato; (D) Ruta de Leloir. Las enzimas numeradas son: 1: β -galactosidasa; 2: fosfo- β -galactosidasa; 3: galactosa-6P isomerasa; 4: tagatosa-6P quinasa; 5: tagatosa 1,6-diP aldolasa; 6: triosa-P isomerasa; 7: glucoquinasa; 8: glucosa-6P isomerasa; 9: fosfofructoquinasa; 10: 1,6-diP-aldolasa; 11: galactoquinasa; 12: glucosa-6P deshidrogenasa; 13: gluconato-6P deshidrogenasa; 14: ribulosa-P epimerasa; 15: fosfocetolasa; 16: gliceraldehído-P deshidrogenasa; 17: lactato deshidrogenasa; 18: acetaldehído deshidrogenasa; 19: alcohol deshidrogenasa.

(concentraciones no limitantes de glucosa, disponibilidad de distintos factores de crecimiento, vitaminas, aminoácidos y precursores de ácidos nucleicos, y cantidad de oxígeno limitada), metabolizan las hexosas produciendo dos moles de ácido láctico y dos moles de ATP por mol de hexosa fermentada, sin producción neta de poder reductor. El enzima clave en esta ruta es la fructosa-1,6-difosfato aldolasa. Estas especies carecen de los enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa siendo por tanto incapaces de fermentar las pentosas o el gluconato.

La fructosa y la manosa también pueden ser fermentadas a través de esta vía por algunas especies de bacterias lácticas, incorporándose a la misma a nivel de la glucosa-6P o de la fructosa-6P, después de una isomerización y/o fosforilación.

B) Ruta del 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa (6-PG/PK) (B en la Figura 2). En ésta se producen, además de ácido láctico, cantidades significativas de otros productos como etanol, acetato o CO₂, motivo por el que se conoce como ruta **heterofermentativa** o **heteroláctica**. El rendimiento energético de esta reacción es un mol de ATP y 3 moles de NADH por mol de hexosa fermentada. Para recuperar el equilibrio redox de la reacción y, en ausencia de aceptores de electrones alternativos, será necesaria 1) la reducción del piruvato a lactato, reacción en la que se oxida uno de los moles de NADH y 2) que el acetil-fosfato se reduzca a etanol. En presencia de aceptores de electrones alternativos, se formará ácido acético en lugar de etanol como producto final.

La fructosa puede ser metabolizada a través de esta ruta de forma análoga a la glucosa y puede también actuar como aceptor de electrones en la oxidación del NADH, reduciéndose entonces gran parte de la misma a manitol según la siguiente reacción:



Las especies heterofermentativas pueden a su vez ser facultativas o estrictas. Las primeras metabolizan las hexosas por la vía de Embden-Meyerhof y además son capaces de transformar las pentosas en lactato y acetato, al poseer una fosfocetolasa inducible por la presencia de pentosas (Kandler, 1983). Esta ruta es utilizada por un grupo de lactobacilos denominados tradicionalmente *Streptobacterium* (Orla-Jensen, 1919). Por el contrario, las heterofermentativas estrictas van a producir por cada mol de glucosa, un mol de ácido láctico, un mol de etanol o acetato y un mol de CO₂, siendo también capaces de fermentar las pentosas produciendo ácido láctico y acético.

Las diferencias entre las bacterias lácticas homo y heterofermentadoras, en lo que a productos finales de la fermentación se refiere, son por tanto consecuencia de diferencias básicas de tipo genérico y fisiológico. Las homofermentadoras poseen los enzimas fructosa 1,6 difosfatoaldolasa y hexosa-isomerasa que no tienen las heterofermentadoras, mientras que éstas últimas poseen una fosfocetolasa, de la que carecen las primeras.

El rendimiento energético de ambas rutas es también claramente diferente. Las bacterias homofermentadoras son capaces de extraer doble cantidad de energía de la fermentación de la glucosa que la que genera la ruta heterofermentativa. Del mismo modo que la cantidad de ácidos producida es mayor en la ruta homofermentativa que en la heterofermentativa.

Además de las diferencias fisiológicas mencionadas, hay que indicar que las condiciones de crecimiento también pueden influir significativamente en los productos finales formados. Estos cambios pueden producirse por la alteración del metabolismo del piruvato y/o por el uso de aceptores de electrones externos, como el O₂ o algunos compuestos orgánicos (Axelsson, 1998).

Además de la glucosa y de la fructosa, existen otros azúcares como la galactosa y la lactosa que también pueden ser fermentados. Para la fermentación de la galactosa existen dos sistemas de transporte, uno dirigido por una fosfotransferasa dependiente del fosfoenolpiruvato (PEP-PTS) y otro que utiliza una permeasa. En el primer caso (C en la Figura 2), la galactosa-6P se incorpora a la ruta de la tagatosa-6P y converge en la glucólisis a nivel del

gliceraldehído-3-fosfato (GAP). En el segundo (D en la Figura 2), el azúcar después de la fosforilación, entra en la glucólisis a través de la denominada ruta de Leloir.

Al igual que para la galactosa, en el transporte de la lactosa pueden estar implicados dos mecanismos: uno de transporte activo con participación de una permeasa y el denominado sistema fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa (PEP-PTS). El sistema permeasa está presente en algunas bacterias termófilas (*S. salivarius* subsp. *termophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* y *L. delbrueckii* subsp. *helveticus*) y en los leuconostocs, mientras que el segundo es propio de los lactococos. En el transporte activo, la lactosa no sufre cambio alguno en el transporte y es posteriormente hidrolizada por una β -galactosidasa (β -gal) a galactosa, que se incorpora a la ruta de Leloir, y a glucosa que puede entrar tanto a la ruta homofermentativa como a la heterofermentativa (Kandler, 1983; Fox et al., 1990).

En el sistema PEP-PTS, la lactosa es fosforilada durante el transporte y entra en la célula como lactosa fosfato. Ésta es posteriormente hidrolizada por una fosfo- β -galactosidasa (P- β -gal) a glucosa, que entra a la glucólisis a través de la vía homofermentativa, y a galactosa-6P, que lo hace a través de la ruta de la tagatosa-6P (De Vos y Vaughan, 1994; Axelsson, 1998). Los sistemas del metabolismo de la lactosa mejor conocidos son los de *Lc. lactis* y *L. casei*.

Con referencia al ácido láctico producido, hay que indicar que existen dos posibles isómeros, el D(-) y el L(+), cuya formación depende de que el enzima que lleve a cabo la reducción del piruvato a lactato sea la D-lactato o la L-lactato deshidrogenasa. Las especies de bacterias lácticas pueden producir sólo uno de los isómeros o una mezcla de ambos, lo que tiene importancia taxonómica. Cuando se producen ambas enzimas, éstos suelen tener distinta actividad, lo que da lugar a un exceso de uno de los isómeros y raramente se produce una mezcla racémica (Fleming et al., 1985).

El isómero L(+) es conocido como el “isómero fisiológico” ya que al ser similar al encontrado en el organismo humano, es mejor asimilado o más rápidamente metabolizado (Montaño et al., 1992). Este hecho propició que el Comité de Expertos de la FAO/WHO en el año 1974, recomendara la

eliminación del isómero D(-) en los alimentos para niños. La importancia del tema hizo que se investigara acerca de la utilización de cepas que produjeran sólo el isómero L(+) en la elaboración de alimentos, investigaciones que llevaron al aislamiento de la especie *L. bavaricus*, que ha sido utilizada en la elaboración a escala industrial de productos como el “sauerkraut” y las leches fermentadas.

1.2.3.2. Metabolismo de los ácidos orgánicos

Las bacterias lácticas son capaces de degradar con cierta facilidad algunos ácidos orgánicos como el málico, el cítrico y el tartárico.

El **ácido málico** es un compuesto que se encuentra en cantidades importantes en los productos vegetales y en el vino, y es un sustrato común para algunas especies de este grupo que lo transforman en láctico y CO₂. El metabolismo de este ácido será descrito con detalle posteriormente.

El **ácido cítrico** está también presente en cantidades apreciables en la mayoría de los vegetales y es abundante en los productos lácteos fermentados, donde es considerado el principal precursor del aroma a “mantequilla” característico.

En enología la formación de compuestos como el acetaldehído, la acetoína y el diacetilo, es atribuida al catabolismo del ácido cítrico, en el que participan las bacterias lácticas. Así, el ácido cítrico es descompuesto en una primera reacción por el enzima citratoliasa a los ácidos acético y oxal-acético, y éste último tras una descarboxilación, en la que participa el enzima oxal-acetato descarboxilasa, se convierte en pirúvico y CO₂ (Fleming et al., 1985). Este piruvato es el punto de partida de otras rutas metabólicas que llevan a la formación de acetaldehído, acetoína y diacetilo. Especies particularmente importantes en la industria por su capacidad para producir estos compuestos a partir del citrato son *Lc. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* y *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*.

El **ácido tartárico**, mayoritario en el mosto de uva y detectado también en vegetales aunque en cantidades poco importantes, es, al igual que el

málico, un buen sustrato para el crecimiento de algunas bacterias lácticas. El mecanismo de degradación del tartárico es diferente según se trate de una bacteria homo o heterofermentadora, produciéndose compuestos distintos en cada caso. Así, mientras las homofermentadoras forman acético, láctico y CO₂, las heterofermentadoras forman acético, CO₂ y cantidades minoritarias de ácido succínico (Radler, 1975).

1.2.3.3. Metabolismo de los compuestos nitrogenados

Las bacterias lácticas son capaces de transformar, utilizando distintas rutas metabólicas, las proteínas, los péptidos y algunos aminoácidos. Para ello han desarrollado sistemas “proteolíticos” complejos que les permiten utilizar eficientemente las fuentes de nitrógeno presentes en los medios de cultivo, liberando péptidos y/o aminoácidos, que serán transportados a través de la membrana citoplasmática, mediante sistemas de transporte específicos, y finalmente utilizados en el interior celular (Law y Kolstad, 1983). A pesar de ello, la presencia de aminoácidos preformados en el medio es de gran utilidad para estas bacterias, dada su limitada capacidad para sintetizar aminoácidos a partir de fuentes de nitrógeno inorgánico (Thomas y Mills, 1981), además de que los aminoácidos pueden ser utilizados como fuente de carbono (Parés y Juárez, 1997).

Los sistemas proteolíticos de las bacterias lácticas son complejos por diversas razones: 1) por la gran variedad de proteinasas y peptidasas que los componen 2) por su difícil localización celular, aspecto éste que plantea serios problemas metodológicos para su estudio y 3) por la multiplicidad de factores que intervienen en la producción y actividad de los mismos.

Todas las bacterias lácticas tienen una gran capacidad proteolítica, pero se observan diferencias significativas entre los diferentes géneros, siendo el sistema proteolítico de *O. oeni* mucho menos conocido que el de los lactococos o el de los lactobacilos.

En el vino, es bien conocido que los péptidos originados por las levaduras durante la fermentación alcohólica, son liberados al medio tras la finalización del proceso (Desportes et al., 2000) pudiendo constituir una fuente

de nitrógeno alternativa para *O. oeni*, que le permite compensar las deficiencias de aminoácidos libres. No obstante, y debido a que las necesidades de nitrógeno de *O. oeni* son muy bajas, no se ha encontrado una buena correlación entre el nivel de nitrógeno y la formación de biomasa (Remize et al., 2006; Ritt et al., 2009).

Asimismo, se han identificado proteinasas extracelulares y péptidos originados por las levaduras (Manca de Nadra et al., 1997; Rollan et al., 1998; Remize et al., 2005) y se ha demostrado que *O. oeni* utiliza oligopéptidos extracelulares (Aredes Fernandez et al., 2004; Ritt et al., 2008) aunque todavía no han sido identificados los transportadores implicados. Además, parece probado que el sistema proteolítico de *O. oeni* no está bien adaptado al transporte y/o a la hidrólisis de péptidos de caseína, lo que reflejaría una adaptación específica de la capacidad de asimilación de nitrógeno de *O. oeni* a su entorno natural, que contiene péptidos originados por las levaduras (Ritt et al., 2009).

Además de la actividad proteolítica, es importante destacar que entre las bacterias lácticas es frecuente encontrar especies capaces de descarboxilar algunos aminoácidos, proceso que lleva a la formación de dióxido de carbono y de la correspondiente amina biógena (Halász et al., 1994). La capacidad aminobiogénica es dependiente de la especie e incluso algunos autores (Beutling, 1996; Bover-Cid y Holzapfel, 1999; Seseña et al., 2005) indican que tiene carácter intraespecífico, habiéndose observado diferencias entre cepas de una misma especie.

La Tabla 3 muestra ejemplos de las aminas biógenas encontradas con mayor frecuencia en los alimentos y los aminoácidos de los que proceden.

Tabla 3. Aminoácidos descarboxilados y aminas biógenas producidas (Shalaby, 1996).

| Aminoácido precursor | Amina biógena |
|----------------------|--------------------|
| Ornitina | Putrescina |
| Arginina | Agmatina |
| Cisteína | Mercapto-etilamina |
| Histidina | Histamina |
| Fenilalanina | Fenilalamina |
| Serina | Etanolamina |
| 5-Hidroxitriptófano | Serotonina |
| Lisina | Cadaverina |
| Tirosina | Tiramina |

El gran interés suscitado por estas aminas, proviene del hecho de que algunas de ellas pueden ser tóxicas incluso ingeridas en bajas concentraciones, por lo que su presencia en los alimentos supone un riesgo importante para los consumidores. Así, la histamina y la tiramina pueden inducir la aparición de reacciones adversas que afectan al sistema nervioso y vascular (Shalaby, 1996; Silla Santos, 1996; Bover-Cid y Holzapfel, 1999), mientras que la putrescina puede reaccionar con los nitritos, compuestos presentes en los productos cárnicos, formando nitrosamina que es cancerígena (Halász et al., 1994).

No obstante, hay que señalar que para que en los alimentos se produzca acumulación de aminas biógenas es necesario que confluyan varias de las siguientes circunstancias: disponibilidad de los aminoácidos precursores, presencia de microorganismos con actividad amino-descarboxilasa y condiciones favorables, tanto para el crecimiento de la bacteria como para la actuación del enzima descarboxilasa correspondiente (ten Brink et al., 1990).

La presencia de estas aminas biógenas ha sido descrita en alimentos fermentados, como los embutidos (Bover-Cid et al., 2001), los lácteos (Stratton et al., 1991; Nieto-Arribas et al., 2009), algunos derivados del pescado (Taylor, 1985), los encurtidos (Silla Santos, 1996; Seseña et al., 2005) o los vinos (Costantini et al., 2006; Landete et al., 2007). En vinos, las aminas biógenas encontradas con mayor frecuencia son la histamina, la tiramina y la putrescina, si bien también se ha descrito la presencia de fenil-etil-amina, triptamina y

cadaverina, en menores concentraciones (Landete et al., 2005). Costantini et al. (2006) afirman no obstante, que la producción de aminas biógenas por cepas aisladas de vino, es muy rara y podría decirse que tiene un carácter excepcional.

Las principales especies responsables de la síntesis de histamina en vino son *L. hilgardii* y *P. parvulus*, aunque *O. oeni*, *L. mali* y *Ln. mesenteroides* también pueden contribuir a su presencia (Landete et al., 2007). Lucas et al. (2008) indicaron que si bien es frecuente encontrar durante la fermentación maloláctica de los vinos cepas de *O. oeni* productoras de histamina, éstas pueden perder dicha capacidad cuando son sub-cultivadas en el laboratorio, lo que explicaría los resultados negativos obtenidos por algunos autores.

La capacidad productora de fenil-etil-amina y de tiramina no está muy extendida entre las bacterias lácticas del vino, habiendo sido descrita en cepas de *L. brevis* y *L. hilgardii*. Algunos autores (Moreno-Arribas et al., 2000; Landete et al., 2007) han encontrado además una correlación entre la síntesis de ambas aminas.

Por último, y respecto de la putrescina hay que indicar que, hasta el momento, sólo se ha identificado una cepa de *O. oeni* capaz de formar esta amina a partir del aminoácido ornitina (Marcobal et al., 2004).

Algunos autores (Bover-Cid et al., 2000; Seseña et al., 2005) indican que los riesgos toxicológicos que pueden suponer la presencia de aminas biógenas en los alimentos, hacen aconsejable la determinación de la capacidad aminobiógena en las cepas que vayan a ser utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración de alimentos fermentados. Esta determinación puede hacerse por distintos métodos, cuantitativos como la cromatografía líquida (Novella-Rodríguez et al., 2000), cualitativos, como el descrito por Bover-Cid y Holzapfel (1999) basado en el cambio de color que se produce en el medio de cultivo como consecuencia del incremento de pH producido por las descarboxilaciones, o moleculares que determinan la presencia de los genes que codifican para las enzimas descarboxilasas implicadas, utilizando para ello la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Marcobal et al., 2005; Lucas et al., 2008; Nannelli et al., 2008).

Por último indicar que las bacterias lácticas pueden llevar a cabo otras transformaciones en los aminoácidos, como son las reacciones de transaminación y de desaminación oxidativa, reacciones que, aunque menos frecuentes, son también de gran importancia ya que conducen a la formación de aldehídos, fenoles, indoles y diferentes compuestos azufrados fuertemente aromáticos, que pueden provocar olores indeseables en los alimentos fermentados (Fox y Wallace, 1997).

1.2.3.4. Otras transformaciones bioquímicas

Por su importancia en el tema que nos ocupa, hemos incluido en este apartado el metabolismo de compuestos como el glicerol, el acetaldehído y determinados ácidos fenólicos, así como la formación de polisacáridos exocelulares (Hidalgo, 2003; Ribéreau-Gayon et al., 2003).

El **glicerol** es uno de los principales constituyentes del vino, tanto por su concentración, entre 5 y 8 g/L, como por su contribución al sabor del mismo, al aportar cierto grado de dulzor. Su presencia en el vino es debida al metabolismo de las levaduras que lo forman durante la fermentación alcohólica en el proceso conocido como fermentación glicero-pirúvica. Algunas cepas de bacterias lácticas están implicadas en su degradación, proceso en el que por acción de una glicerol-deshidratasa, transforman el glicerol en β -hidroxipropionaldehído, compuesto precursor de la acroleína. Desde la época de Pasteur este proceso es conocido como “el amargor de los vinos” (Hidalgo, 2003), debido al sabor amargo que proporcionan los compuestos resultantes de la unión de la acroleína con los taninos del vino (Ribéreau-Gayon et al., 2003).

El **acetaldehído** es uno de los compuestos volátiles más importantes desde el punto de vista sensorial, interviniendo además en la estabilización del color rojo de los vinos tintos. Al igual que sucedía para el glicerol, este compuesto se origina principalmente durante la fermentación alcohólica por el metabolismo de las levaduras, y puede ser degradado por algunas bacterias lácticas produciendo etanol y ácido acético. Así, y dependiendo del tipo de vino que se desee elaborar, deberá utilizarse durante la fermentación maloláctica

una cepa de bacteria que sea o no capaz de llevar a cabo dicha degradación (Osborne et al., 2000).

Los **ácidos fenólicos** (cinámico, ferúlico, p-cumárico y cafeico) se encuentran en el vino en forma esterificada con el ácido tartárico y pueden ser transformados, primeramente por la acción de enzimas esterasas y luego mediante descarboxilación, en los vinil-fenoles y etil-fenoles correspondientes, que presentan olores defectuosos a “farmacia”, “goma” e incluso “sudor de caballo”. Las levaduras son las principales responsables de esta alteración (Shinohara et al., 2000), si bien las bacterias lácticas también pueden formar estos compuestos aunque en menor proporción (Cavin et al., 1993; Hidalgo, 2003).

Por último, es importante mencionar que entre las bacterias lácticas es frecuente encontrar especies capaces de sintetizar **polisacáridos exocelulares**. Éstos pueden ser homopolímeros de glucosa, como el dextrano y el glucano, o de fructosa conocidos como levanos, o incluso heteropolímeros. De todos ellos el más conocido, tanto por su estructura como por su biosíntesis y aplicaciones, es el dextrano, producido por *Ln. mesenteroides*.

La producción de polisacáridos exocelulares en vinos se traduce en un aumento de la viscosidad, alteración conocida como “vinos filamentosos” o “ahilados”, que es claramente observable cuando las poblaciones de las bacterias productoras alcanzan las 10^7 ufc/mL (Lonvaud-Funel y Joyeux, 1993). Las especies que con mayor frecuencia ocasionan esta alteración son *P. damnosus* y *Ln. mesenteroides*. En general, los “vinos filamentosos” no presentan otros defectos organolépticos y para disminuir la viscosidad basta con una acción mecánica o batido del vino, que destruye la unión entre las bacterias, lo que produce una rápida clarificación.

1.2.3.5. Otros aspectos del metabolismo

Es bien conocido que las bacterias lácticas producen diversos compuestos, ácidos orgánicos, etanol, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetaldehído, benzoatos, aminoácidos y algunos compuestos no proteicos de pequeño tamaño molecular, como la reuterina y

las bacteriocinas (Ouwehand, 1998), con potente efecto antimicrobiano, algunos de los cuales son utilizados como conservantes de alimentos.

Los mecanismos por los que estos compuestos ejercen su efecto antimicrobiano son diversos. Así por ejemplo, en los ácidos orgánicos (láctico, acético, etc.) es la fracción no dissociada de los mismos la que ejerce la actividad antimicrobiana al interferir con funciones metabólicas esenciales (Baird-Paker, 1980), mientras que el dióxido de carbono, considerado un antimicrobiano de amplio espectro, actúa tanto disminuyendo el pH extra e intracelular como por desestabilización de las membranas celulares, donde se acumula (Eklund, 1984). El diacetilo, inhibidor de un gran número de bacterias, actúa reaccionando con la arginina de los enzimas microbianos, inactivándolos al bloquear o modificar sus centros catalíticos (Jay, 1986).

Una mención destacada merecen las **bacteriocinas** que han sido definidas como “proteínas o complejos proteínicos con actividad bactericida (Klaenhammer, 1988; Schillinger, 1990; Daeschel, 1992) que actúan sobre la pared celular de las bacterias sensibles induciendo la lisis celular” (Bruno et al., 1992). Es característico además que afecten principalmente a especies próximas, desde el punto de vista filogenético, a la especie productora, con las que comparten habitualmente un nicho ecológico, lo que proporciona a las bacterias productoras una gran ventaja a la hora de competir por los mismos nutrientes (Diep y Nes, 2002; Eijsink et al., 2002).

Se han descrito diferentes métodos, directos e indirectos, para la determinación de la capacidad bacteriocinogénica de las bacterias (De Vuyst y Vandamme, 1994), si bien muchos de ellos tienen el mismo fundamento y consisten en la determinación del efecto inhibitor del crecimiento de un microorganismo denominado “indicador” en contacto con el medio que contiene la bacteriocina. Recientemente, De Jong et al. (2006) presentaron una herramienta informática denominada BAGEL (<http://bioinformatics.biol.rug.nl/websoftware/bagel>) que permite la identificación de bacteriocinas y de sus agrupaciones biosintéticas, mediante una base de datos.

Entre las bacterias lácticas de origen enológico productoras de bacteriocinas, cabe destacar algunas cepas de *L. plantarum* (Holo et al., 2001; Rojo-Bezares et al., 2007a; Navarro et al., 2008), *P. pentosaceus* (Strasser de Saad y Manca de Nadra, 1993), *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* y *L. fructivorans* (Yurdugül y Bozoglu, 2002). No se han identificado cepas de *O. oeni* productoras de bacteriocinas, si bien se ha descrito que esta especie es sensible a las bacteriocinas nisina, plantaricina y pediocina (Nel et al., 2002) producidas por otras bacterias lácticas.

Respecto de la utilización de las bacteriocinas en el control del proceso de vinificación, hay que indicar que, aunque se ha demostrado la estabilidad de las mismas en las condiciones de la vinificación y que no producen efectos negativos sobre el crecimiento de las levaduras o sobre el perfil sensorial del vino (Bauer et al., 2003; Rojo-Bezares et al., 2007b; Knoll et al., 2008; Bartowsky, 2009), su uso en dicho proceso todavía no ha sido aprobado.

Para concluir, es importante resaltar que, a pesar de la enorme variedad de compuestos con actividad antimicrobiana que las bacterias lácticas son capaces de producir, es el efecto combinado de la competencia por los nutrientes del medio donde crecen y el descenso de pH del mismo, causado por la producción de ácidos (láctico, acético y otros), el que, a criterio de algunos autores (Daeschel, 1989; Lindgren y Dobrogosz, 1990), ejerce la principal acción antimicrobiana.

1.2.4. IDENTIFICACIÓN Y GENOTIPADO DE BACTERIAS LÁCTICAS

Tradicionalmente, la identificación microbiana se ha basado en el estudio de características fenotípicas, como la morfología celular y colonial, propiedades fisiológicas, bioquímicas e inmunológicas y/o en el estudio de la composición de ciertos constituyentes celulares. Estas pruebas aunque presentan algunos inconvenientes, como su escaso poder discriminante (Kandler y Weiss, 1986) o el que son muy laboriosas y en ocasiones económicamente costosas, son todavía muy utilizadas, aunque en ningún caso como único criterio de identificación.

El desarrollo de la Biología Molecular y la simplificación de las técnicas que ésta utiliza, han permitido su incorporación en estudios taxonómicos lo que ha supuesto un importante avance, al utilizar criterios de clasificación basados en la comparación de los genomas de los microorganismos.

Así, los métodos utilizables en la identificación de los microorganismos pueden por tanto agruparse en tres grandes grupos:

- **Métodos fenotípicos** que analizan características que son expresadas por los microorganismos.
- **Métodos físico-químicos** que estudian determinados componentes celulares, como los lípidos, los azúcares o las proteínas.
- **Métodos moleculares** que analizan el genoma de los microorganismos.

1.2.4.1. Métodos fenotípicos

La identificación fenotípica de un microorganismo es su asignación a un taxón determinado por comparación de sus características (morfológicas, bioquímicas o fisiológicas) con las de los diferentes taxones de la clasificación. Las características a determinar y su número dependen tanto del tipo de microorganismo, como del conocimiento que del mismo se persiga, y hay que tener en consideración que, si bien individualmente analizadas no permiten establecer relaciones filogenéticas entre los microorganismos, sí proporcionan una información descriptiva de gran interés y constituyen la base para la descripción formal de los taxa, desde familias y géneros hasta especies y subespecies.

Entre los principales inconvenientes de los marcadores fenotípicos cabe destacar el que no son expresados de forma estable bajo diferentes condiciones ambientales o de cultivo y que no pueden ser utilizados con bacterias no cultivables. Otros inconvenientes son su escasa reproducibilidad, ya que algunos de estos caracteres pueden verse afectados por diversos factores, y su escaso poder discriminante, lo que limita su uso en estudios de tipificación de cepas, especialmente en el grupo de las bacterias lácticas dada su gran heterogeneidad.

La ventaja que presentan la mayoría de estos ensayos es la facilidad de realización, ya que existen sistemas comerciales que permiten una fácil y rápida determinación.

Los métodos fenotípicos, a pesar de que por si solos resultan en ocasiones insuficientes para la correcta identificación de las especies, siguen en vigor y han sido ampliamente utilizados para la identificación de diferentes grupos de bacterias.

Entre los ensayos realizados habitualmente para la identificación de bacterias se encuentran:

- La determinación de la morfología celular y colonial.
- El carácter Gram.
- La determinación de la actividad metabólica o bioquímica frente a diferentes sustratos, fermentación de azúcares, producción de enzimas, etc. En estos ensayos se suelen utilizar sistemas miniaturizados como las tiras API (BioMérieux, Francia).
- El estudio de las características fisiológicas (crecimiento a diferentes temperaturas, pHs, con diferentes concentraciones de NaCl, etc.).
- La determinación del perfil de fagos (fagotipia) a los que es sensible la cepa en estudio. Éste es un método con un gran poder de discriminación, pero su utilización está limitada en gran parte por la falta de estandarización metodológica.
- La serotipificación, que estudia las propiedades antigénicas de las cepas. Su uso al igual que en el caso anterior está limitado por problemas metodológicos, además de que existen cepas no tipificables serológicamente.
- La antibiotipificación, que estudia los patrones de susceptibilidad a los antibióticos (antibiotipo). La utilización de este procedimiento está limitada por la capacidad de los microorganismos para modificar estos patrones, entre otras razones por la pérdida de plásmidos.

1.2.4.2. Métodos físico-químicos

Los métodos físico-químicos más utilizados para la identificación de las bacterias lácticas son: el análisis del perfil de ácidos grasos totales, la determinación de las peptidoglucan-hidrolasas, el análisis del perfil de proteínas celulares totales, la determinación del espectro infrarrojo mediante la transformada de Fourier y más recientemente la espectrometría de masas MALDI-TOF.

1) Análisis del perfil de ácidos grasos totales

El análisis de los ácidos grasos totales por cromatografía en fase gaseosa, tras la extracción, saponificación y esterificación de los mismos, conocido como método FAME (Fatty Acids Methyl Esters), es un método rápido, sensible y selectivo que permite la identificación de un elevado número de especies microbianas, aunque no siempre permite la diferenciación de cepas.

La identificación se realiza comparando el perfil cromatográfico obtenido para la cepa en estudio, con aquellos de una base de datos, aunque a menudo para llegar a la identificación a nivel de especie, no es suficiente con realizar un análisis cualitativo de los resultados, siendo necesario un análisis cuantitativo de los mismos. Además, y para la obtención de resultados fiables, hay que fijar y estandarizar de manera muy rigurosa las condiciones de cultivo de los microorganismos a analizar, dado que la composición en ácidos grasos puede verse afectada por factores tales como el aporte nutricional, la temperatura de incubación, la aireación y la edad del cultivo.

Decallone et al. (1991) y Gilarova et al. (1994) efectuaron estudios acerca de la aplicación de este método en la identificación de bacterias lácticas y Rizzo et al. (1987) lo utilizaron para la identificación de algunas especies de *Lactobacillus*. Asimismo, ha sido descrita su utilización en la diferenciación de cepas de *Lactobacillus sake* y de *Lactobacillus curvatus* (Dykes et al., 1995; Rementzis y Samelis, 1996).

2) Determinación de las peptidoglucan-hidrolasas

Se trata de enzimas endógenas de la pared celular bacteriana muy bien conservadas a nivel de especie, pudiendo encontrarse varias de éstas con especificidades distintas, coexistiendo en la pared celular.

Su análisis puede efectuarse fácilmente empleando el método del zimograma, tras efectuar una electroforesis SDS-PAGE de las proteínas totales. En éste, las proteínas separadas en la electroforesis, se renaturalizan tras lo cual el gel se incuba con otro que contiene el sustrato de estas enzimas, paredes celulares de *Micrococcus luteus*. Tras la incubación se observan bandas fácilmente visibles producidas por la hidrólisis del peptidoglucano de la pared celular, que se corresponden con las PG-hidrolasas (Leclerc y Asselin, 1989).

Este método fue patentado y utilizado para la identificación de algunas especies de *Lactobacillus* por Lortal et al. (1997), pero no se han descrito citas posteriores que describan su utilización en tareas de identificación.

3) Análisis del perfil de proteínas celulares totales

La expresión del genoma de una célula microbiana resulta en la síntesis de diversas proteínas, por lo que puede considerarse que éstas son una copia “indirecta” del mismo, razón por la que el análisis del perfil de proteínas ha sido utilizado en tareas de caracterización, clasificación e identificación microbiana.

La separación de una mezcla de proteínas celulares totales en un gel mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), origina un perfil complejo que puede también considerarse como una “huella dactilar” (fingerprint) del microorganismo que está siendo analizado. El inconveniente de esta técnica es que con frecuencia ocurre que cepas bacterianas de una misma especie o de especies muy próximas, presentan perfiles proteicos poco diferenciables. Esta técnica ha sido utilizada con éxito para la identificación de bacterias lácticas por diferentes autores (Sánchez et al., 2003; Piraino et al., 2006; Ouadghiri et al., 2008).

4) Determinación del espectro infrarrojo mediante la transformada de Fourier (IR-TF)

Las propiedades de absorción de las células bacterianas enteras en el infrarrojo mediano ($4000-600\text{ cm}^{-1}$), pueden ser utilizadas como método de identificación de las mismas, ya que cada individuo posee un espectro IR-TF específico y reproducible, como si de una “huella dactilar” se tratara. Allouch et al. (1998) indicaron que se trataba de uno de los métodos físico-químicos más prometedores en tareas de identificación por su sencillez metodológica. Estudios más recientes (Beekes et al., 2007) indican que la especificidad de la técnica es muy alta, lo que permite una diferenciación a nivel de subespecie, serotipo o cepa. Si bien, para que la identificación sea exitosa resulta fundamental encontrar estrategias adecuadas de pre-procesamiento de los espectros, que compensen la variabilidad experimental e instrumental (Preisner et al., 2007).

Entre sus ventajas cabe destacar que es un método rápido y sencillo que puede realizarse a partir de una colonia aislada sin necesidad de subcultivos. Ha sido utilizado para la identificación rápida de algunos estreptococos (Goodacre et al., 1996), enterococos (Kirschner et al., 2001) y lactococos (Lefier et al., 2000).

5) Espectrometría de masas MALDI-TOF

El método MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization/Time-Of-Flight) es un método basado en el análisis por espectrometría de masas de los cultivos bacterianos, que ha sido desarrollado en los últimos años. Entre sus ventajas cabe destacar su gran versatilidad y la rapidez de los análisis, si bien son numerosos los factores experimentales que pueden influir en la calidad y en la reproducibilidad de los espectros obtenidos, siendo la preparación de las muestras el factor más influyente (Tracie et al., 2003).

Este método proporciona una información detallada de la biología y de la química bacteriana, basándose en la detección de productos químicos específicos o en la medición de los cambios químicos que ocurren en

respuesta a influencias externas ambientales, temporales o de cualquier otra índole (Lay, 2001). Por este motivo, los espectros MALDI han sido considerados, más que como métodos de identificación en sí mismos, como información complementaria a los datos obtenidos a partir de otros métodos de identificación bacteriana.

Este método ha sido utilizado con éxito para la caracterización e identificación de diversos géneros de bacterias incluido el género *Streptococcus* (Dupont et al., 2009; Lartigue et al., 2009; Seng et al., 2009).

1.2.4.3. Métodos moleculares

La secuencia de bases de los ácidos nucleicos es un marcador genético que puede ser utilizado para la diferenciación de especies y cepas. En estos métodos se utiliza bien el genoma entero, como en el caso de las hibridaciones ADN/ADN, o una parte del mismo, como ocurre en la secuenciación de los ARNs ribosomales.

Los métodos moleculares tienen grandes ventajas como su universalidad, sensibilidad, resolución y poder discriminante, si bien en algunos casos es necesario conocer las secuencias de ciertos genes para su aplicación. Para ello se puede recurrir a los bancos de datos accesibles a través de Internet, como el EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl>) o el GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Los métodos más utilizados en la identificación y/o genotipado de bacterias lácticas son:

1) Secuenciación de los genes codificantes del ARN ribosómico

Los ácidos ribonucleicos ribosómicos (ARNr) son una herramienta casi ideal para el estudio de la evolución y del parentesco microbiano, ya que su secuencia, debido a su papel crítico y constante en el ribosoma, se mantiene muy conservada durante la evolución. Los ARNr poseen secuencias variables y secuencias constantes, que pueden ser utilizadas para comparar tanto microorganismos muy próximos como muy alejados filogenéticamente.

Las bacterias poseen tres tipos de ARNr, designados por su coeficiente de sedimentación como fracción 23S, 16S y 5S, cuyos genes se encuentran normalmente organizados en un operón y separados entre sí por secuencias intergénicas llamadas ITS (internal transcribed spacer). La fracción 16S del ARNr ha sido la más estudiada ya que su tamaño permite una secuenciación rápida y suministra además mucha información. Actualmente se dispone de numerosas secuencias de la fracción 16S del ARNr en las bases de datos mundiales, lo que facilita la identificación. Así, un microorganismo desconocido puede ser identificado en función del alineamiento de la secuencia de su ARNr 16S con las secuencias disponibles en estas bases de datos.

Para especies de un mismo género existe un alineamiento en las secuencias superior al 90% y para cepas de una misma especie este valor es superior al 99%.

Este método se ha utilizado para identificar cepas de *Lactobacillus* (Rodas et al., 2003) y para establecer la filogenia del género *Lactobacillus* y géneros asociados (Rodas et al., 2006).

2) Estudio de los perfiles plasmídicos

Los plásmidos son elementos de ADN extracromosómicos, generalmente circulares, de doble cadena, superenrollados, que se replican y transcriben independientemente del ADN cromosómico y que pueden tener diferentes tamaños. Son muy frecuentes entre los lactococos y los lactobacilos.

En la aplicación más básica de la técnica de tipado de plásmidos, éstos deben ser extraídos y separados por electroforesis en geles de agarosa para determinar su número y tamaño.

Las principales desventajas de esta técnica son 1) la inestabilidad de los perfiles, ya que los plásmidos pueden perderse, total o parcialmente, o pasar de una célula a otra por conjugación, y 2) el que su aplicación está supeditada a que la especie posea estos elementos (Farber, 1996).

El análisis de los perfiles plasmídicos ha sido utilizado con éxito en la caracterización de cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Ward et al., 2004)

y en la monitorización de cultivos iniciadores de bacterias lácticas en embutidos (Garriga et al., 2005).

3) Hibridación ADN/ADN

Es el método reconocido para la definición de nuevas especies, entendidas éstas como un grupo de hibridación ADN/ADN. El método consiste en la desnaturalización del ADN genómico de las cepas en estudio (A y B) y posterior renaturalización de la mezcla. La formación del heteroduplex A-B será proporcional a la semejanza existente entre los dos genomas, calculándose un % de reasociación.

Este método sólo permite identificaciones a nivel de especie o subespecie y, a pesar de ser el método de referencia, es tan complejo y largo que no se emplea de forma rutinaria. Todas las especies pertenecientes a los distintos géneros de bacterias lácticas han sido estudiadas y comparadas por este método (Schleifer et al., 1995; Choi et al., 2003).

4) Hibridación con sondas

Una sonda es un fragmento de ADN monocatenario capaz de hibridar con otro ADN que posea exactamente la secuencia nucleotídica complementaria. Estas sondas se pueden emplear bien directamente sobre una colonia bacteriana, técnica conocida como Dot-Blot o hibridación "*in situ*", o sobre ADNs separados por electroforesis, técnica conocida como Southern Blot. Si la sonda se prepara a partir del ADN de una cepa patrón conocida, se pueden identificar cepas bacterianas desconocidas y cuando la sonda es un fragmento de un gen específico, la hibridación permitirá identificar cepas bacterianas portadoras de dicho gen.

La capacidad discriminante de esta técnica se puede ajustar desde el nivel de reino hasta el de especie o cepa, en función de la secuencia de la sonda elegida (Farber, 1996).

Para la identificación de bacterias lácticas se ha utilizado el método del Dot-Blot inverso con sondas preparadas a partir de secuencias de las fracciones 16S y 23S del ARNr (Ehrmann et al., 1994).

5) Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP)

Esta técnica consiste en la desnaturalización térmica del ADN en condiciones que no permiten una nueva reasociación, de forma que las dos cadenas separadas acabarán plegándose sobre si mismas hasta adquirir su conformación más estable. Las conformaciones resultantes serán diferentes para cada microorganismo y podrán ser separadas mediante electroforesis capilar.

Aunque esta técnica se ha utilizado habitualmente para estudiar polimorfismos génicos, en algún estudio se ha descrito su utilización para la identificación de especies de bacterias lácticas en quesos (Duthoit et al., 2003; Delbès et al., 2007).

6) Métodos basados en el estudio del polimorfismo de restricción

Estos métodos tienen como fundamento la digestión del ADN con enzimas de restricción específicos, que producen fragmentos de distintos tamaños que son separados por electroforesis.

Los enzimas de restricción reconocen secuencias de ADN muy específicas, de una longitud de entre 4 y 7 nucleótidos, cortando la doble cadena de ADN en ese lugar de reconocimiento. Si el enzima elegido para el análisis corta en pocos puntos el ADN objeto de estudio, los fragmentos obtenidos serán de gran tamaño, en cuyo caso para su separación será necesario utilizar la denominada electroforesis de campo pulsado o **PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)** (Schwartz y Cantor, 1984). En ésta, el campo eléctrico aplicado cambia de dirección alternativamente lo que obliga a los fragmentos de ADN a reorientarse después de cada cambio, permitiéndoles así avanzar. El perfil o “pattern” de fragmentos de ADN obtenidos tras la restricción con uno o varios enzimas y su posterior separación mediante PFGE,

es también considerado una “huella genética” de la cepa objeto de estudio. Persing (1993) indicó que el uso de varias enzimas de restricción y el posterior análisis combinado de los perfiles obtenidos, aumenta el poder de discriminación de esta técnica, aunque multiplica el trabajo y dificulta el análisis de los perfiles.

Este método ha sido descrito como el más discriminante a nivel intraespecífico de los utilizados para el genotipado de bacterias lácticas, teniendo además una buena reproducibilidad. Sin embargo, es laborioso y caro, lo que limita su aplicación cuando se trata de analizar un elevado número de muestras (Blaiotta et al., 2001; Sánchez et al., 2004).

Ha sido utilizado para la caracterización de la microbiota láctica aislada de la fermentación de vinos (Lechiancole et al., 2006) y encurtidos (Sánchez et al., 2004), para monitorizar fermentaciones dirigidas de embutidos y quesos (Blaiotta et al., 2001) y para la caracterización de cepas de *Lc. lactis* (Kahala et al., 2008), *L. plantarum* (Huch Née Kostinek et al., 2008), *L. casei* (Cronin et al., 2007) y *O. oeni* (Zapparoli et al., 2000; Lechiancole et al., 2006) entre otras.

En el caso de la técnica conocida como ribotipia o ribotipaje, se realiza la digestión del ARNr y posteriormente los fragmentos obtenidos se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o nylon, donde se lleva a cabo la hibridación con una sonda marcada, mediante Southern Blot (Rodtong y Tannock, 1993).

El número y tamaño de las bandas será variable entre cepas, por lo que puede emplearse tanto para la identificación a nivel de especie como para la separación de cepas dentro de una misma especie. Esta técnica ha sido utilizada para la diferenciación de especies de *Lactobacillus* (Mañes-Lázaro et al., 2008) y para caracterizar cepas industriales de lactobacilos y bifidobacterias (Satokari et al., 2003).

7) Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)

En 1983, Mullis de Cetus (Perkin-Elmer Cetus Corporation, Norwalk CT) desarrolló un proceso conceptualmente simple, para amplificar o incrementar el

número de copias de fragmentos específicos de un ácido nucleico presentes en una muestra. El consecuente desarrollo y automatización de este proceso, denominado "reacción en cadena de la polimerasa" o PCR (Polymerase Chain Reaction), fue considerado "el mayor desarrollo científico del año" y la Taq polimerasa, enzima empleada en el mismo, recibió la consideración de "molécula del año". En el año 1993, Kary Mullis recibiría el premio Nobel de Química por el desarrollo de dicha técnica.

La PCR es un método de síntesis enzimática de ADN *in vitro*, que permite obtener múltiples copias de un segmento de ADN predeterminado a partir de: 1) cebadores o "primers", que son secuencias de oligonucleótidos que hibridan en las cadenas complementarias del ADN que actúa como molde, flanqueando el fragmento que va a ser amplificado, 2) la Taq ADN polimerasa, enzima termoestable aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, que cataliza la elongación de dichos oligonucleótidos en la dirección 5' → 3' utilizando para ello 3) los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) que son añadidos en exceso en la mezcla de reacción.

La secuencia de los cebadores utilizados puede ser la de un gen conocido, o bien la correspondiente a regiones variables de los ARNr 16S y 23S o de las regiones intergénicas (ITS) de una especie bacteriana (PCRs específicas) o por el contrario tratarse de una secuencia arbitraria, como ocurre en la técnica denominada Randomly Amplified Polymorphic DNA o RAPD que describiremos más adelante.

La Figura 3 muestra las etapas de cada ciclo de PCR:

1. **Desnaturalización** por calor del ADN bicatenario diana o molde.
2. Enfriamiento posterior que permite el reconocimiento del cebador y su acoplamiento con el ADN molde (**anillado o hibridación**). Un exceso de cebador en relación al ADN molde asegura que la mayor parte de las cadenas diana hibriden con cebadores y no entre sí.
3. **Extensión** del cebador, por acción de la Taq ADN polimerasa, que utiliza las cadenas diana del ADN como moldes.

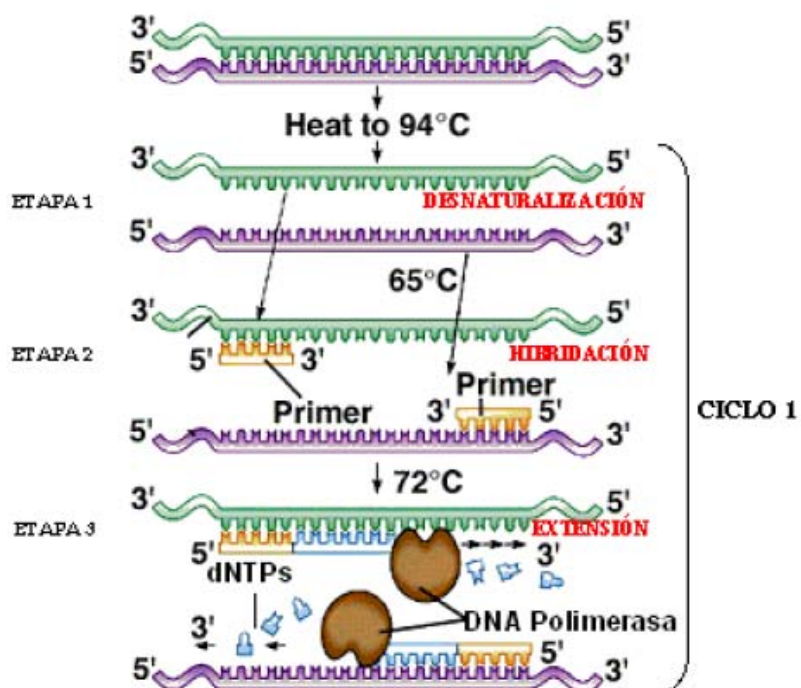


Figura 3. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cada hebra de ADN recién sintetizada sirve de molde para las reacciones siguientes por lo que, repitiendo los ciclos de desnaturalización-hibridación-extensión, se podrá amplificar de modo exponencial el fragmento delimitado por los cebadores. En la práctica suelen realizarse unos 20-30 ciclos, lográndose así un incremento de unas 10^6 - 10^{11} veces la cantidad inicial de ADN (Persing, 1993). El principal inconveniente de esta técnica es su gran susceptibilidad a la contaminación con ADN extraño.

El carácter altamente repetitivo del proceso ha permitido su automatización y la comercialización de equipos programables, denominados termocicladores, donde llevarlo a cabo. Por todo ello, puede afirmarse que, en la actualidad, es el método más utilizado en numerosos campos de investigación científica.

En los últimos años se han publicado innumerables trabajos en el campo de la enología que utilizan esta técnica tanto para identificar especies de bacterias lácticas, utilizando cebadores específicos (Zapparoli et al., 1998) como para otros fines (Costantini et al., 2006; Lucas et al., 2008).

En la actualidad se está trabajando en el desarrollo de protocolos para llevar a cabo reacciones de PCR cuantitativas a tiempo real, que no sólo detecten la presencia de determinadas especies, sino también que sean capaces de cuantificarlas (Hierro et al., 2007; Schmidt et al., 2008; Collado et al., 2009).

Además de la reacción de PCR propiamente dicha, existen otras técnicas basadas en ella, como la **Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)** descrita por Williams et al. (1990), ampliamente utilizadas en el genotipado de bacterias lácticas y en la monitorización de fermentaciones dirigidas. En ésta se produce una amplificación aleatoria del ADN utilizando cebadores inespecíficos, de secuencia arbitraria y de tamaño corto (10-20 nucleótidos). La utilización de estos cebadores, más cortos que los de la PCR tradicional, permite trabajar con temperaturas de hibridación más bajas, lo que facilita que el cebador hibride en lugares para los cuales el emparejamiento es imperfecto, lo que a su vez aumenta la probabilidad de que se anille en distintos lugares del genoma. Si algunos de estos sitios de unión están orientados de manera opuesta o palindrómica en el ADN molde y lo suficientemente cercanos como para permitir la amplificación, se generará un producto en la reacción de PCR.

En una reacción de RAPD se generan numerosos fragmentos de amplificación de diferentes longitudes nucleotídicas y, por tanto, de diferentes pesos moleculares, que al ser sometidos a una electroforesis en gel de agarosa se separan, obteniéndose un patrón de bandas –RAPD fingerprint o huella RAPD- específico de cada cepa.

Williams et al. (1990) destacaron como principal ventaja de esta técnica el que no requiere un conocimiento previo de la secuencia a amplificar, ni de la bioquímica y biología de las especies objeto de estudio, ya que los cebadores que utiliza se unen al genoma bacteriano al azar, obteniéndose perfiles con cualquier cepa.

La técnica RAPD tiene además otras ventajas:

- Es rápida y metodológicamente sencilla ya que no requiere ningún tratamiento o preparación previa de la muestra.

- Pueden utilizarse cebadores “universales” para el análisis genómico de una amplia variedad de especies.

Aunque por sus ventajas la utilización de esta técnica se está extendiendo, hay constantes referencias al hecho de que la reproducibilidad inter- e incluso intra-laboratorios se hace casi imposible, por la importancia que en la misma tienen el tipo de polimerasa y/o el termociclador utilizados. Pero éstos no son los únicos factores que pueden influir en los resultados, lo son también la concentración de magnesio y algunas sales utilizadas en la reacción, el tipo, la composición y la pureza del cebador así como su longitud, la temperatura de hibridación, la concentración de ADN, etc. Por todo ello, es esencial que las condiciones del análisis sean cuidadosamente controladas, para lograr así una adecuada reproducibilidad.

La RAPD ha sido utilizada con éxito en estudios de biodiversidad genética en productos lácteos (Coppola et al., 2006), en encurtidos (Sánchez et al., 2004), en la monitorización de procesos como la fermentación de cárnicos (Fontana et al., 2005) y para el tipado de bacterias lácticas de vino (Zapparoli et al., 2000; Guerrini et al., 2003; Reguant y Bordons, 2003; Beneduce et al., 2004; Rodas et al., 2005). Además, se ha demostrado su eficacia como técnica de identificación cuando se incluyen en los ensayos cepas de referencia con las que comparar (Sánchez et al., 2004).

Otra de las técnicas basadas en la reacción de PCR es la **Differential Display PCR (DD-PCR)**, técnica que ha sido utilizada para la identificación de genes expresados de manera diferencial, ya que permite una detección sensible, rápida y precisa de eventuales modificaciones en el patrón de expresión génica. Se ha descrito su utilización en la caracterización de genes expresados en bacterias como *Legionella pneumophila* (Kwaik y Pederson, 1996), en organismos eucariotas (Hakki y Akkaya, 2001) y más recientemente, Lechiancole et al. (2006) la utilizan en estudios de diversidad genética en la especie *O. oeni*.

La **Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)** es también una técnica que había sido utilizada en diferentes estudios de discriminación intraespecífica en bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Erwinia* y

Mycoplasma (Gancheva et al., 1999; Rico et al., 2004; Hong et al., 2005) y que recientemente Capello et al. (2008) utilizaron, por vez primera, para el genotipado de cepas de *O. oeni*. Los autores describen haber alcanzado una gran diferenciación intraespecífica si bien indican que es necesario realizar estudios comparativos con otras técnicas, dada su gran complejidad.

El análisis **ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)** es otra técnica basada en la reacción de PCR que, aunque sin capacidad de discriminación intraespecífica, ha sido utilizada con éxito en la identificación de aislados del género *Lactobacillus* (Rodas et al., 2003 y 2005; Mañes-Lázaro et al., 2008) y *O. oeni* (Solieri et al., 2010) obtenidos de muestras de mosto y vino. En ésta, primero se amplifica el fragmento 16S del ADNr y a continuación se corta el amplificado con enzimas de restricción, obteniéndose tras su separación en un gel de agarosa, un perfil de bandas característico de la especie.

Por último, merecen ser destacadas la **Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)** y la **Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE)**. Ambas técnicas han demostrado ser adecuadas para la caracterización de comunidades microbianas procedentes de una gran variedad de nichos ambientales (agua marina, suelos, cuevas, etc.) y se han utilizado en estudios de diversidad de bacterias lácticas en algunos ecosistemas alimentarios (Meroth et al., 2003; Miambi et al., 2003; Ercolini, 2004; Pérez Pulido et al., 2005; Renouf et al., 2007). Tienen entre sus ventajas el que permiten 1) la determinación de las especies integrantes de una comunidad microbiana y el conocimiento de los cambios que en la misma pueden producirse a lo largo del tiempo y 2) la detección rápida y relativamente económica de cualquier especie, incluso de las no cultivables.

En estas técnicas, tras extraer el ADN total de la muestra en estudio, se amplifica mediante una reacción de PCR, una región del ARNr 16S con una secuencia de bases nucleotídicas hipervariable. La mezcla de amplificados resultante es sometida a un gradiente de desnaturalización, de urea o formamida (DGGE) o de temperaturas (TTGE), en un gel de poliacrilamida, para conseguir así su separación. Se obtiene de esta forma un patrón de

bandas o “patrón genético” de las poblaciones mayoritarias de la comunidad analizada. Las bandas pueden ser seguidamente extraídas y secuenciadas, lo que permite identificar a los integrantes de cada población y establecer relaciones filogenéticas.

La Figura 4 muestra a modo de resumen las técnicas fenotípicas, físico-químicas y moleculares potencialmente utilizables en estudios taxonómicos y en el tipado de bacterias, indicándose en cada caso el nivel de resolución.

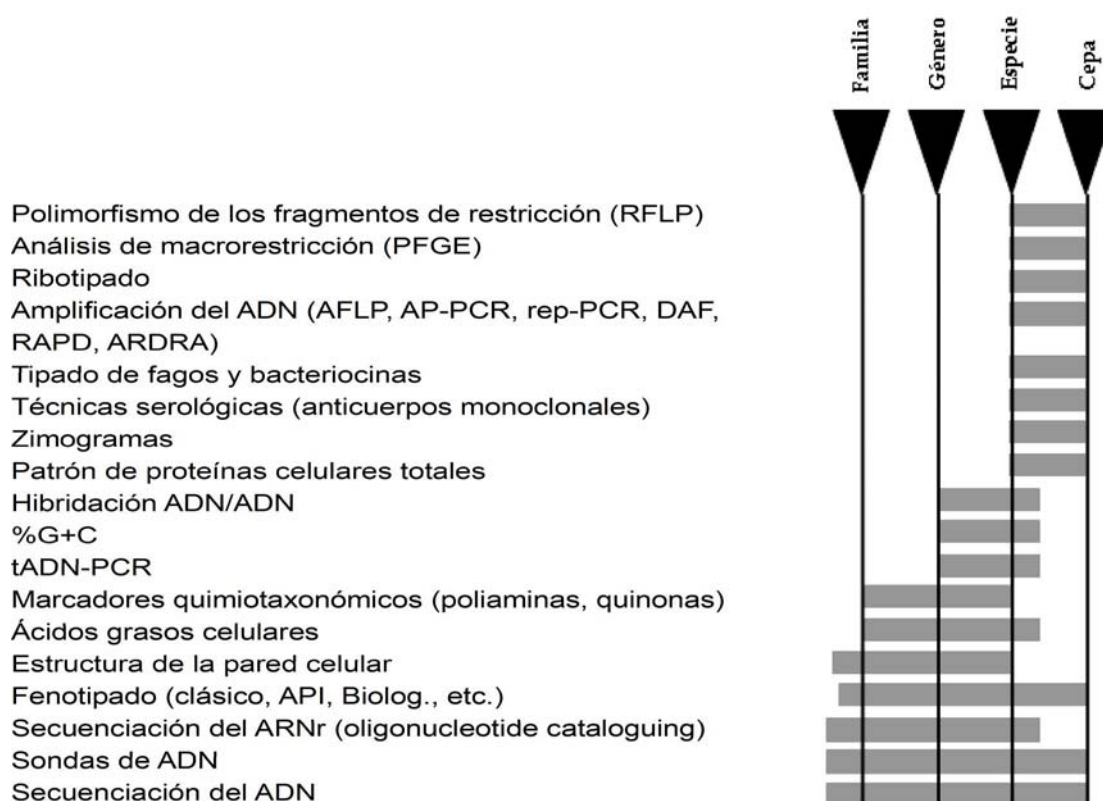


Figura 4. Nivel de resolución de las técnicas comúnmente utilizadas en el análisis taxonómico de bacterias (Vandamme et al., 1996). PFGE: Electroforesis de campo pulsado; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; AFLP: Fragmentos amplificados de tamaño polimórfico; AP-PCR: PCR con oligonucleótidos arbitrarios; rep-PCR: PCR de elementos repetitivos; DAF: Huellas dactilares por amplificación de ADN; RAPD: ADN polimórfico amplificado al azar; ARDRA: Análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado por PCR.

1.2.5. APLICACIONES DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las innumerables investigaciones llevadas a cabo sobre la fisiología y la genética de las bacterias lácticas han hecho posible un conocimiento muy profundo de las mismas y en algunos aspectos ha sido posible comprender cómo funciona este grupo de bacterias, en apariencia “simples” (Konings et al., 2000).

En los últimos años han sido utilizadas como modelo de bacterias Gram-positivas para estudios fisiológicos y genéticos (Konings et al., 2000) y se ha conseguido la secuenciación del genoma completo de las especies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL 1403 (Bolotin et al., 2001) y *Lactobacillus plantarum* JDM1 (Zhang et al., 2009).

El conocimiento adquirido ha permitido asimismo mejorar e innovar sus aplicaciones en el campo de las fermentaciones industriales, del bioprocesado, la agricultura, la alimentación y la nutrición y, más recientemente, de la medicina (Berlec y Strukelj, 2009; Oddone et al., 2009).

En la industria, son muchas las aplicaciones de las bacterias lácticas pero, y a pesar de su antigüedad, la más importante sigue siendo su utilización como **cultivos iniciadores** en la elaboración de alimentos. Actualmente son los microorganismos más utilizados en fermentaciones alimentarias.

La Tabla 4 muestra un ejemplo de algunos de los alimentos obtenidos con participación de estas bacterias y las principales especies participantes.

Entre las aplicaciones más novedosas en este campo destaca su utilización en la fermentación de cereales, por su capacidad para hidrolizar el gluten, principal proteína de los cereales panificables, y los fitatos, principal factor antinutricional presente en los cereales y en los vegetales, lo que evita la aparición de reacciones alérgicas.

Tabla 4. Bacterias lácticas utilizadas como cultivos iniciadores en la industria alimentaria (Leroy y De Vuyst, 2004).

| Alimento fermentado | Especie utilizada como cultivo iniciador |
|-----------------------------|--|
| Queso | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>S. thermophilus</i> |
| Mantequilla | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> |
| Yogurt | <i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> |
| Leches fermentadas | <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>Bifidobacterium</i> (B.) <i>lactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> |
| Kefir | <i>L. kefir</i> , <i>L. kefiranofacies</i> , <i>L. brevis</i> |
| Embutidos europeos | <i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i> |
| Embutidos americanos | <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> |
| Pescados fermentados | <i>L. alimentarius</i> , <i>C. piscicola</i> |
| Sauerkraut | <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i> |
| Aceitunas | <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> |
| Encurtidos | <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>P. cerevisiae</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> |
| Cereales fermentados | <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. panis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>Weissella cibaria</i> |
| Vino | <i>O. oeni</i> |
| Sake | <i>L. sakei</i> |

Otro de los usos más importantes y actuales de las bacterias lácticas es como **probióticos**. Los probióticos han sido definidos por Guarner y Schaafsma (1998) como “microorganismos vivos, no patógenos que, ingeridos en determinado número, ejercen efectos saludables, más allá de los inherentes a la nutrición básica”. Las bacterias lácticas son huéspedes habituales del tracto gastrointestinal de humanos y animales, donde contribuyen a las complejas interacciones entre la microbiota intestinal y el hospedador, actuando de forma beneficiosa en la fisiología del hospedador y en su sistema inmune. Esto hace mejorar el balance nutricional y microbiano en el tracto

gastrointestinal del hospedador, motivos por los que las bacterias lácticas están siendo utilizadas como probióticos (Martín et al., 2009; Salazar et al., 2009).

Se ha demostrado que las bacterias lácticas pueden producir efectos beneficiosos en la prevención y tratamiento clínico de diarreas (Heyman y Ménard, 2002), en la mejora de la digestión de la lactosa en individuos deficientes en lactasa, en la prevención y tratamiento de ciertas alergias y enfermedades inflamatorias del intestino, en la modulación de los mecanismos inmunitarios a nivel de las mucosas, en el aumento de la capacidad de los linfocitos para producir diversas citoquinas y en el tratamiento de la hipercolesterolemia, entre otros (Salminen et al., 1998).

Los géneros de bacterias lácticas más estudiados y utilizados como probióticos son el género *Lactobacillus* y el género *Streptococcus*, además del *Bifidobacterium* y las preparaciones comerciales disponibles contienen con mucha frecuencia las especies, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. lactis*, *L. reuteri* y *L. johnsonii*.

La demanda creciente de este tipo de productos por consumidores cada día más preocupados por la salud, es la razón por la que el mercado internacional de estos productos no ha dejado de incrementarse en los últimos años.

Otra de las aplicaciones de las bacterias lácticas es la **producción industrial de compuestos** como el ácido láctico, el etanol, biopolímeros como los dextranos, o las bacteriocinas. Así por ejemplo, en los últimos años se ha incrementado de manera notable el uso de especies productoras de **exopolisacáridos** como *Ln. mesenteroides*, en la elaboración de productos lácteos fermentados, yogures batidos y descremados o quesos de bajo contenido graso. La presencia de estos polímeros naturales aumenta la viscosidad, mejora la textura y evita el desuerado y, por consiguiente, hace innecesario el uso de agentes viscosizantes o texturizantes artificiales, obteniéndose así alimentos 100% naturales. Algunos de estos biopolímeros tienen además importantes propiedades prebióticas.

Las **bacteriocinas**, como ha sido mencionado anteriormente, son también importantes productos utilizables como conservantes, aunque su uso

está supeditado a la modificación de la legislación vigente. La nisina es la única bacteriocina cuya utilización como conservante alimentario está autorizada actualmente.

Pero sin duda, una de las aplicaciones más innovadoras es su utilización como **vehículo oral para vacunas**. Características de las bacterias lácticas tales como su carácter “amigable” con la flora de la mucosa gastrointestinal y vaginal, su carácter no invasivo, la capacidad para permanecer viables en el organismo un tiempo adecuado (10-15 días) y la de ser capaces de llegar a distintos lugares en el organismo, las convierten en un vehículo ideal para expresar o liberar antígenos y/o proteínas terapéuticas en los lugares más recónditos del organismo. Algunos autores (Mohamadzadeh et al., 2008; Zahradnik et al., 2009) han estudiado su utilización como vehículo para la inmunización oral contra microorganismos patógenos.

1.3. LA VINIFICACIÓN

La vinificación es el conjunto de operaciones y prácticas que se llevan a cabo para transformar la uva en vino, respetando al máximo las cualidades intrínsecas de la misma, a fin de obtener el mejor resultado posible (Suárez e Íñigo, 1990).

La fermentación del mosto para su transformación en vino es un proceso bioquímico complejo, en el que intervienen e interaccionan diversos microorganismos, fundamentalmente levaduras y bacterias, pudiendo ocurrir de forma espontánea o natural o de forma dirigida o intencionada, mediante la adición de microorganismos determinados y adecuados para que lleven a cabo el proceso.

Cuando el mosto recién extraído es colocado en las cubas, contiene una gran variedad de microorganismos, hongos, levaduras y bacterias, provenientes tanto de la uva como de los materiales utilizados en las bodegas, que pueden iniciar el proceso, aunque de forma progresiva, y como consecuencia de los cambios ocurridos en las condiciones del medio y de las interacciones específicas entre ellos, se produce una selección natural de los mismos (Ribéreau-Gayon et al., 2003). Han sido numerosos los estudios

realizados para conocer la sucesión de microorganismos que tiene lugar durante la fermentación espontánea de los mostos (Lafon-Lafourcade et al., 1983b; Fleet et al., 1984; Querol et al., 1994; Egli et al., 1998).

En la elaboración del vino, y en lo que al proceso microbiológico se refiere, hay que distinguir dos etapas principales: la **fermentación alcohólica** (FOH), que habitualmente sucede en primer lugar, y la **fermentación maloláctica** (FML).

1.3.1. LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La FOH es el proceso por el que los azúcares del mosto son convertidos en etanol, dióxido de carbono y diferentes productos metabólicos, contribuyendo todos ellos a la composición química y a la calidad sensorial del vino.

En esta etapa se produce un antagonismo entre las levaduras y las bacterias presentes en el mosto, producido por los efectos tóxicos de los metabolitos segregados por las primeras, como el etanol y determinados ácidos grasos (hexanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico), imponiéndose habitualmente el desarrollo de las levaduras, dada su mejor adaptación al pH bajo y a la alta concentración de azúcares del mosto (Lonvaud-Funel et al., 1988; Alexandre et al., 2004).

Durante la FOH se suceden diferentes especies y cepas de levaduras (Ribéreau-Gayon et al., 1975; Lafon-Lafourcade, 1983) y así, en los primeros dos o tres días de fermentación, los géneros mayoritarios son *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida* y en menor medida *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula* y *Metschnikowia* (Querol et al., 1990; Fleet y Heard, 1993). Seguidamente, estos géneros reducen su población y dan paso al crecimiento de otros más tolerantes al etanol como el género *Saccharomyces*. De hecho, *Saccharomyces cerevisiae* es considerada la principal especie responsable de la FOH en el vino (Ribéreau-Gayon, 1985).

Diversos estudios (Fleet et al., 1984; Heard y Fleet, 1986) han mostrado no obstante, que algunas especies no-*Saccharomyces*, como *Kloeckera*

apiculata, *Candida stellata* y *Candida colliculosa*, también contribuyen de forma importante a la fermentación, ya que sobreviven en esas condiciones, pudiendo alcanzar poblaciones de 10^6 - 10^7 ufc/mL. El crecimiento cuantitativamente significativo de estas levaduras tiene una gran importancia ya que influye en la composición organoléptica del vino y, además, repercute en la cinética de la fermentación y en el comportamiento bioquímico de las *Saccharomyces*, al producir modificaciones en la composición del mosto.

Cuando la concentración de azúcares y de etanol en el medio hacen difícil el crecimiento de las levaduras, se produce la lisis de las mismas y la consiguiente liberación de sustancias (vitaminas, bases nitrogenadas, péptidos y aminoácidos, etc.) que pueden ser utilizadas como nutrientes por las bacterias allí presentes, lo que estimula su crecimiento, iniciándose la denominada **fermentación maloláctica**.

1.3.2. LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA

La FML es una etapa esencial en la vinificación de los vinos tintos, en la que, por acción de las bacterias lácticas, se transforma el ácido málico en ácido láctico y CO_2 , produciéndose por tanto una disminución de la acidez total. Se trata por tanto de un proceso de desacidificación biológica.

Se producen además otras transformaciones que llevan a la formación de diferentes productos secundarios, lo que provoca importantes modificaciones en la composición química de los vinos y en las cualidades organolépticas de los mismos (Davis et al., 1985; Kunkee, 1991).

1.3.2.1. Bioquímica del proceso

En la estequiometría de la reacción global de transformación (Figura 5) la fermentación de 1 g de ácido málico produce 0,67 g de ácido láctico y alrededor de 167 cm^3 de CO_2 .

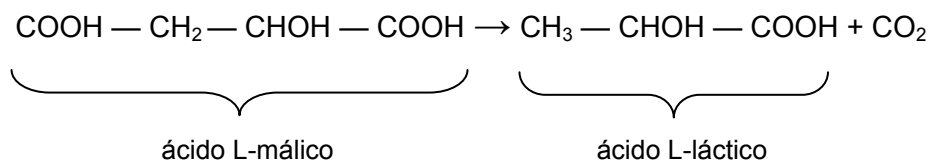


Figura 5. Metabolismo del ácido málico por las bacterias lácticas.

La reacción así formulada se presenta como una simple descarboxilación del ácido málico, pero el mecanismo de transformación de dicha molécula no es tan simple. Se han descrito tres posibles vías según se forme o no un producto intermedio que es el ácido oxalacético.

Para Charpentie (1954), el mecanismo más probable es el que muestra la Figura 6, en el que sucede una primera deshidrogenación, que lleva a la formación de ácido oxalacético, una posterior descarboxilación, que lleva a la formación de ácido pirúvico, y finalmente una reducción de éste hasta ácido láctico, reacción en la que se utiliza el hidrógeno liberado en la primera deshidrogenación y en la que interviene una deshidrogenasa láctica.

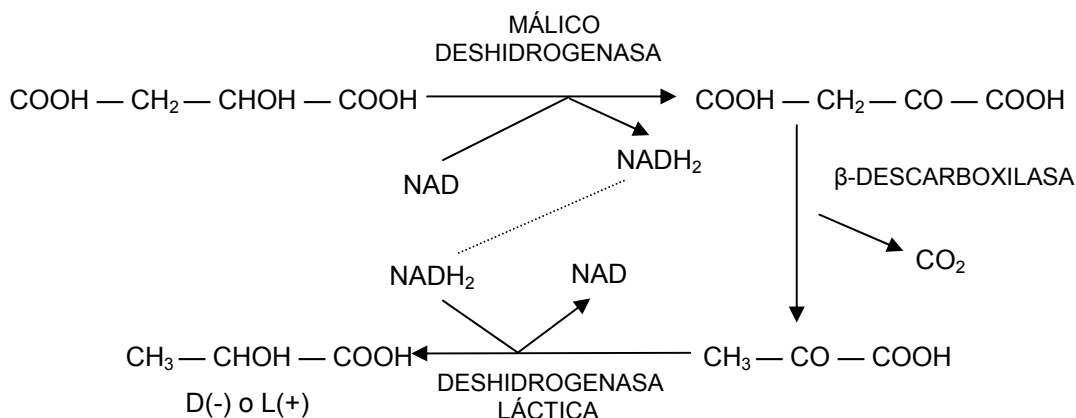


Figura 6. Proceso de transformación del ácido málico con formación de los ácidos oxalacético y pirúvico.

La transformación del ácido málico en ácido láctico puede hacerse por una segunda vía en la que participa una enzima, denominada **enzima maloláctica (EML)**, que Ochoa et al. (1950) aislaron del hígado de palomas y de células de *Lactobacillus (L.) arabinosus* adaptadas a la fermentación del

ácido málico. La reacción se lleva a cabo en presencia de NAD e iones Mn^{2+} y en ella tiene lugar un proceso redox, en el que en una etapa intermedia se forma ácido pirúvico (Figura 7).

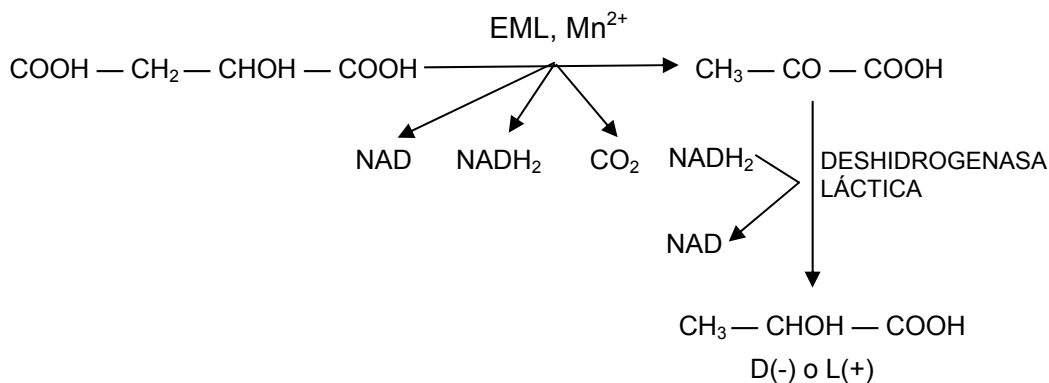


Figura 7. Proceso redox de formación de ácido láctico a partir del málico.

La enzima maloláctica participante en esta reacción está muy extendida en la naturaleza y ha sido localizada en vísceras animales, tejidos de plantas superiores y en diversas bacterias como *Escherichia coli* y algunas bacterias lácticas.

Ambos mecanismos son igualmente probables en el vino, ya que las bacterias lácticas allí presentes poseen todos los enzimas necesarios para llevarlos a cabo.

En la tercera vía posible actúa una enzima maloláctica que transforma directamente el ácido málico en ácido L(+) láctico (Figura 8).

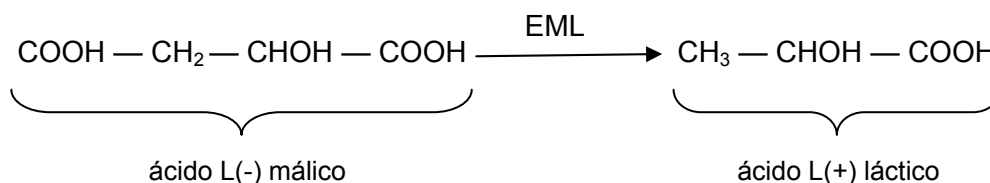


Figura 8. Transformación del ácido málico.

En este proceso el transporte de L-malato al interior celular limita la tasa de conversión del enzima, pudiendo actuar como inhibidores competitivos algunos ácidos como el tartárico, el succínico y el láctico.

La presencia de la enzima maloláctica fue puesta de manifiesto por vez primera por Radler et al. (1970) en *L. plantarum* y posteriormente Spettoli et al. (1984) la aislaron en *O. oeni*, demostrando que, en esta especie tenía un carácter constitutivo a diferencia de *L. plantarum*, en la que es inducible. Más tarde se ha comprobado que ésta es constitutiva en el 60% de las bacterias lácticas heterofermentadoras.

De las tres posibles vías, esta última es para algunos investigadores (Lafon-Lafourcade, 1983b), la predominante en el vino, pero cualquiera que sea la vía utilizada para la transformación del ácido málico, lo que es cierto es que durante la fermentación maloláctica se produce 1) un importante incremento de la población de bacterias lácticas, alcanzándose valores entre 10^6 y 10^8 ufc/mL, 2) una disminución de la acidez del vino, que se refleja en un incremento del pH de entre 0,1 y 0,3 unidades, y 3) una abundante liberación de gas.

1.3.2.2. Microbiología del proceso

La fermentación maloláctica se inicia cuando, como consecuencia de los cambios producidos en el medio, se produce un importante crecimiento de las bacterias lácticas y acéticas presentes en el vino.

Las **bacterias acéticas** encontradas con mayor frecuencia son especies aerobias estrictas pertenecientes a los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* o *Gluconoacetobacter* (Boulton et al., 1996; Ribéreau-Gayon, 2000). Su presencia afecta negativamente ya que alteran las características organolépticas del vino, al producir ácido acético, acetaldehído y acetato de etilo (Du Toit y Pretorius, 2002) y pueden, en algunos casos, provocar un enlentecimiento de la fermentación.

Las **bacterias lácticas** del vino son especies microaerófilas, capaces de crecer en las condiciones de anaerobiosis que se dan en un vino en fermentación y pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*,

Pediococcus y *Oenococcus* (Ribéreau-Gayon, 2000) (Figura 9), siendo la especie predominante *Oenococcus oeni* (Van Vuuren y Dicks, 1993).

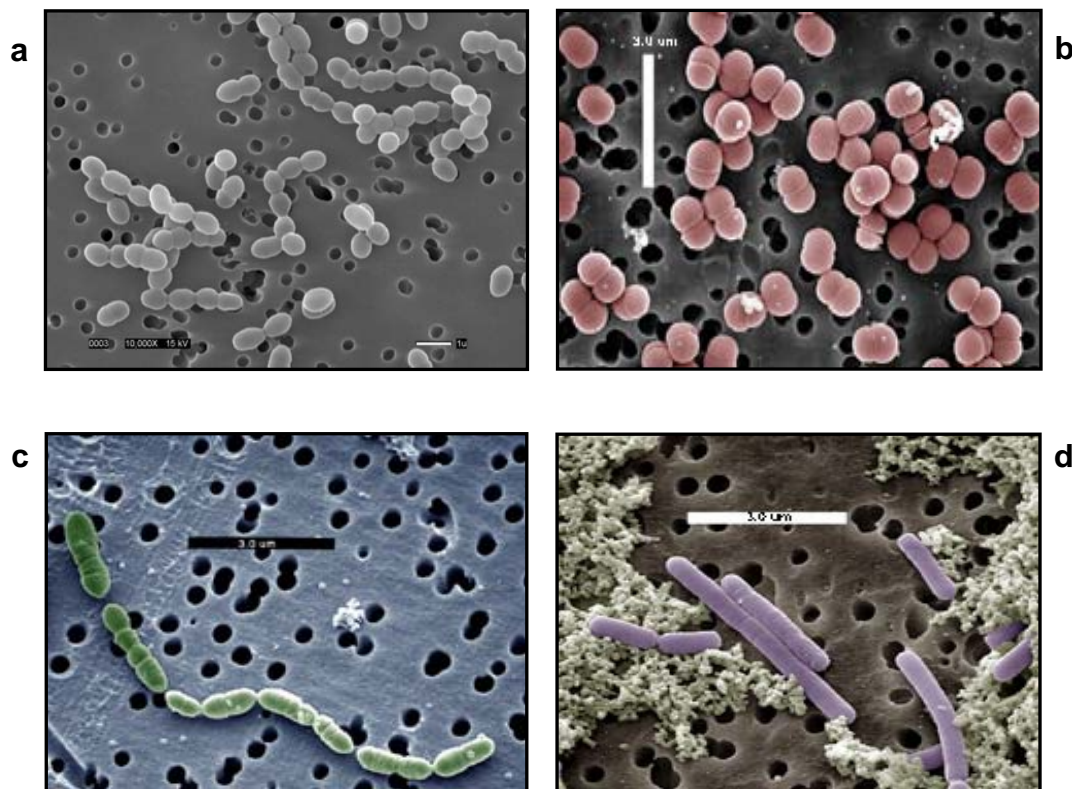


Figura 9. Géneros de bacterias lácticas presentes en el vino. a) *Leuconostoc*, b) *Pediococcus*, c) *Oenococcus*, d) *Lactobacillus*.

Estos géneros muestran una gran diversidad en lo que a sus comportamientos en el vino se refiere, lo que tiene una gran importancia práctica, ya que según sea su desarrollo en la FML los resultados pueden ser muy diferentes, afectando incluso a la conservación del vino.

Así por ejemplo, el carácter homo o heterofermentativo en el catabolismo de los azúcares, influirá notablemente en la actividad enológica y así, de los géneros anteriormente mencionados, *Pediococcus* es homofermentativo, mientras que *Leuconostoc* y *Oenococcus* son heterofermentativos. El género *Lactobacillus* puede presentar ambos comportamientos dependiendo de las especies.

Seguidamente se hace una breve descripción general de los cuatro géneros participantes:

- Género ***Leuconostoc***: sus especies poseen células esféricas o un poco alargadas (cocobacilos), de 0,5-0,7 μm de diámetro y de entre 0,7 y 1,2 μm de longitud, agrupadas en parejas o cadenas cortas, no móviles, no esporuladas, anaerobias facultativas, quimiorganotrofas, mesófilas y con una temperatura óptima de crecimiento entre los 20 y los 30 °C. No hidrolizan la arginina y tienen carácter heterofermentativo. El porcentaje G+C se encuentra entre el 38 y el 44% y no poseen ácido teicoico en la pared celular (Ribéreau-Gayon et al., 2003).

- Género ***Pediococcus***: son cocos de 1 a 2 μm de diámetro, que se dividen en dos planos ortogonales lo que conduce a la formación de tétradas. A diferencia del género anterior no son quimiorganotrofas y necesitan medios ricos que contengan azúcares fermentables para su crecimiento. Sus especies son homofermentativas, con un porcentaje G+C de entre el 34 y el 42% y tampoco poseen ácido teicoico en la pared celular (Ribéreau-Gayon et al., 2003).

- Género ***Oenococcus***: posee una única especie *O. oeni*, que presenta células esféricas o cocobacilares, agrupadas en parejas o cadenas cortas, no móviles, no esporuladas y anaerobias facultativas. Su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre los 20 y los 30 °C, presentando un metabolismo heterofermentativo. La arginina es hidrolizada sólo por ciertas cepas y no producen dextrano a partir de la sacarosa. Pueden crecer en medios con un 10% de etanol y con pHs bajos, incluso inferiores a 4,8, como sucede en el vino. El porcentaje G+C es muy similar al de los géneros anteriores.

- Género ***Lactobacillus***: presenta morfología bacilar con células que se agrupan en parejas o cadenas de tamaño variable según las especies. Son inmóviles, no esporuladas y anaerobias facultativas. Son quimiorganotrofas y dependiendo de las especies presentan un metabolismo homo o heterofermentativo. El porcentaje G+C está entre el 36 y el 47% y muchas de sus especies poseen ácidos teicoicos en su pared (Ribéreau-Gayon et al., 2003).

1.3.2.3. Ecología del proceso

Como hemos mencionado anteriormente, durante los primeros días de la FOH, y como consecuencia de la mejor adaptación a las condiciones del mosto, las levaduras invaden el medio de forma rápida alcanzándose en poco tiempo elevadas poblaciones (Ribérerau-Gayon et al., 2003). Durante este tiempo, las bacterias lácticas que se encontraban presentes en la uva en baja concentración (10^2 ufc/mL en uva estrujada), se multiplican de manera muy controlada hasta alcanzar valores de 10^4 - 10^5 ufc/mL (Figura 10). Más tarde, durante la fase más activa de la FOH y hasta el agotamiento de los azúcares, entran de nuevo en regresión alcanzando recuentos de 10^2 - 10^3 ufc/mL, pudiendo por lo tanto afirmarse que durante la FOH, la población bacteriana se mantiene latente, como consecuencia del crecimiento activo de las levaduras y de las sustancias inhibitoras (ácidos grasos, etanol, anhídrido sulfuroso, etc.) producidas por éstas (King y Beelman, 1986; Lonvaud-Funel et al., 1988; Edwards et al., 1990).

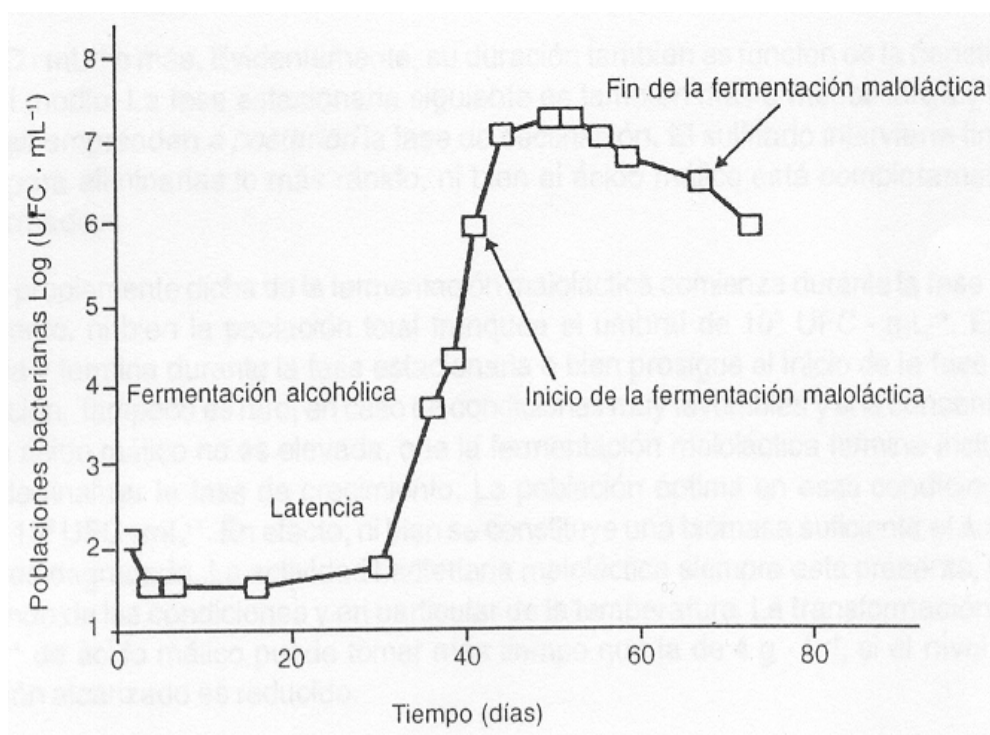


Figura 10. Evolución de la población de bacterias lácticas durante la vinificación (Ribérerau-Gayon et al., 2003).

En condiciones normales, una vez finalizada la FOH y tras el descube del vino, se inicia el crecimiento de las bacterias lácticas. Si éstas inician su desarrollo antes de que se hayan agotado los azúcares del mosto, se produce lo que se denomina picado láctico, proceso en el que estas bacterias además de consumir los azúcares, metabolizan el ácido málico, produciendo una importante subida de la acidez volátil del vino.

La FML propiamente dicha se inicia cuando las bacterias mejor adaptadas al medio comienzan a multiplicarse de forma exponencial hasta alcanzar una población de 10^6 - 10^7 ufc/mL (Ribérerau-Gayon et al., 2003), dependiendo la duración de esta etapa de las condiciones del medio. Tras este crecimiento exponencial, la población alcanza una fase estacionaria que puede ser más o menos larga y que continuará con una fase de declive, en la que se observa una caída de la población. El sulfitado que se realiza habitualmente en este momento hace caer casi en su totalidad, la población de bacterias (≤ 1 - 10 ufc/mL) que, de otra forma, podrían metabolizar diversos compuestos, produciendo un efecto perjudicial desde el punto de vista organoléptico (Beneduce et al., 2004).

Durante la vinificación, y como consecuencia de los cambios ocurridos, se produce una sucesión de especies de bacterias (Tabla 5). Así, mientras en la uva antes de la cosecha es habitual encontrar aislados de *Lactobacillus* de las especies *L. plantarum*, *L. hilgardii* y *L. casei* (Carre, 1982), en los mostos de uva, inmediatamente después de ser llevados a la cuba, la microflora es más variada e incluye especies de lactobacilos (*L. plantarum*, *L. casei*, *L. hilgardii*, *L. brevis*, *L. fructivorans*), pediococos (*P. damnosus*, *P. pentosaceus* y *P. parvulus*), *Leuconostoc mesenteroides* y *Oenococcus oeni* (Edwards y Jensen, 1992; Lonvaud-Funel, 1999). Si bien, no todas las especies están siempre presentes o, cuando menos, no siempre pueden ser aisladas utilizando los medios de cultivo tradicionales.

Tabla 5. Especies de bacterias lácticas más frecuentes en mostos y vinos (Ribéreau-Gayon et al., 1998; Flanzy, 1998).

| Morfología celular | Naturaleza | Especie | Ácido láctico producido |
|--------------------|--------------------------------|---|---|
| Bacilos | Heterofermentativo facultativo | <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> | L(+) L(+) D(-) |
| | Heterofermentativo obligatorio | <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Lactobacillus fructivorans</i> <i>Lactobacillus buchneri</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> | L(+) D(-) L(+) D(-) L(+) D(-) L(+) D(-) L(+) D(-) |
| | Homofermentativo | <i>Lactobacillus mali</i> | L(+) ó L(+) D(-) |
| Cocos | Homofermentativo | <i>Pediococcus damnosus</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Pediococcus parvulus</i> | L(+) D(-) L(+) D(-) L(+) D(-) |
| | Heterofermentativo | <i>Oenococcus oeni</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | D(-) D(-) |

Durante la fermentación maloláctica tiene lugar una selección natural de las especies, como consecuencia de la adaptación a las condiciones hostiles que se dan en el medio, de forma que las especies de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Ln. mesenteroides* desaparecen progresivamente o permanecen en concentraciones no detectables, mientras que *O. oeni* se hace cada vez más patente y llega a ser la única especie identificada al final de la fermentación maloláctica en muchos de los estudios realizados (Lonvaud-Funel et al., 1991).

Se han realizado diferentes estudios de caracterización de las bacterias lácticas presentes en vinos de distintas D.O. españolas, de los que merecen ser destacados aquellos de González et al. (1998) que estudian vinos de la D.O. Navarra; el de Lopez et al. (2003 y 2007) que estudian vinos de la D.O. Rioja y el de Rodas et al. (2005) que estudian vinos de las D.O. Utiel-Requena y Jumilla. En la revisión bibliográfica efectuada, no se han encontrado referencias referidas a vinos elaborados en Castilla-La Mancha, objetivo de

estudio de esta Tesis Doctoral. Sólo Izquierdo et al. (2004) realizan un estudio de caracterización de la microbiota láctica en vinos Cencibel elaborados en Castilla-La Mancha.

Otros autores (Zavaleta et al., 1997; Zapparoli et al., 2000) han realizado estudios similares en vinos de España, Perú, Chile e Italia.

1.3.2.4. Factores que influyen en el crecimiento de las bacterias lácticas en el vino

Entre los numerosos factores que pueden influir en el crecimiento de las bacterias lácticas en el vino destacan la presencia de nutrientes y los factores físico-químicos del medio.

La composición en nutrientes del vino no parece ser un factor limitante del crecimiento de estas bacterias, ya que la autólisis de las levaduras ocurrida al final de la fermentación alcohólica, pone a su disposición los nutrientes necesarios para su crecimiento.

Por el contrario, las condiciones físico-químicas si son factores a tener en consideración ya que podrían inhibir su crecimiento, produciendo la paralización del proceso. Entre los más importantes están el pH, la temperatura, el contenido alcohólico y el contenido en SO₂.

Las bacterias lácticas crecen de forma rápida en el vino cuando este alcanza valores de **pH** iguales o superiores a 3,5, y el crecimiento se hace mucho más lento a pH inferiores a 3,0. La detención del crecimiento debida a la acidez del medio, ocurre cuando el pH intracelular alcanza un determinado valor, que depende no solo del pH del medio, sino también de la naturaleza de los ácidos presentes (McDonald et al., 1990). El límite inferior tolerado para el pH intracelular varía según las especies, lo que hace que el pH tenga un carácter selectivo sobre las especies que van a estar presentes en el vino (Wibowo et al., 1985).

Los vinos extremadamente ácidos (pH<3,3), requieren de la adición de agentes desacidificantes como el carbonato cálcico, para favorecer el inicio de la FML y por el contrario, aquellos con un pH relativamente elevado, que

presentan una microbiota láctica no solamente más abundante sino también mucho más variada, tienen el riesgo de sufrir importantes alteraciones. Valores de pH comprendidos en el intervalo de 3,5 a 3,7 podrían considerarse óptimos para la correcta evolución de la FML (Liu y Gallander, 1983).

La **temperatura** y el contenido en **etanol** son factores que influyen en la fase de latencia y en la tasa de crecimiento de las bacterias lácticas, estando además íntimamente relacionados. Así, para contenidos en etanol comprendidos entre el 0 y el 4% (v/v) el crecimiento óptimo ocurre a temperaturas próximas a los 30 °C, mientras que cuando el contenido en etanol aumenta hasta valores entre el 10% y el 14%, son preferibles temperaturas en torno a los 18 °C (Flanzy, 1998).

En la práctica, la temperatura del vino en los depósitos suele mantenerse próxima a los 18 °C, ya que temperaturas superiores pueden causar daños en el vino además del efecto letal combinado que pueden ejercer contenidos elevados de alcohol (>7%) y elevadas temperaturas (>30 °C) sobre el crecimiento de las bacterias lácticas.

Por sí sólo, el etanol puede ejercer un efecto estimulante o inhibidor del crecimiento dependiendo de las concentraciones y así, concentraciones de etanol inferiores al 4% (v/v) favorecen el crecimiento mientras que éste se ve fuertemente inhibido cuando se alcanzan valores de etanol entre el 13 y el 14% (v/v) (Boulton et al., 1996; Flanzy, 1998; Suárez e Íñigo, 2004). No obstante, este efecto parece tener carácter inter e intraespecífico ya que algunos autores (Kalmar, 1995) han descrito la presencia de cepas de *L. fructivorans*, *L. brevis* y *L. hilgardii* en vinos con un contenido en etanol entre el 16 y el 20 % (v/v).

El **dióxido de azufre** (SO₂) se encuentra en el vino tanto en forma libre como en forma combinada, encontrándose ambas formas en equilibrio. Este es un importante agente antimicrobiano y un eficaz instrumento para inhibir el desarrollo de las bacterias lácticas ya que, en su forma libre y al pH intracelular, reacciona con diversos constituyentes celulares provocando la inhibición del crecimiento e incluso la muerte bacteriana (Carrete et al., 2002). Por regla general, dosis a partir de 10 mg/L de SO₂ libre son suficientes para impedir el desarrollo de las bacterias lácticas en el vino, si bien existen diferencias incluso

de carácter intraespecífico. Así, por lo general, los cocos son menos resistentes que los bacilos (Lafon-Lafourcade y Peynaud, 1974) aunque se han descrito cepas de la especie *Pediococcus damnosus* denominadas “filamentosas”, que no sólo son insensibles a las dosis de SO₂ que inhiben o matan a otras cepas de la misma especie, sino que son capaces de crecer en vinos con contenidos de SO₂ libre de 50 mg/L (Lonvaud-Funel et al., 1988), alcanzándose poblaciones de 10⁴-10⁶ ufc/mL.

El dióxido de azufre combinado ejerce también un efecto inhibitor del crecimiento, aunque este es entre 5 y 10 veces menos activo que el SO₂ libre (Lafon-Lafourcade y Peynaud, 1974). Las bacterias lácticas son capaces de metabolizar la fracción aldehído de la forma combinada, produciéndose la forma libre.

Otros compuestos presentes en el vino que puede ejercer un efecto inhibitor del crecimiento de las bacterias lácticas son los **polifenoles** procedentes de la uva, y los **ácidos grasos** generados por las levaduras, especialmente el decanoico. Su acción es no obstante, mucho menos importante porque las concentraciones necesarias para ejercer un efecto inhibitor, 500 mg/L y 30 mg/L respectivamente, son superiores a las habitualmente encontradas en el vino (Edwards y Beelman, 1987; Stead, 1993; Vivas et al., 1997; Flanzy, 1998; Alberto et al., 2001).

Por último mencionar que la presencia de otros microorganismos, en especial mohos, bacterias acéticas y virus bacterianos, puede afectar de forma notable al crecimiento de las bacterias lácticas en el vino. Sozzi et al. (1976 y 1982) indicaron que las interrupciones bruscas de la FML, suelen estar provocadas por ataques de fagos, que producen una destrucción total de la población de *O. oeni*.

1.3.2.5. Desarrollo y control de la fermentación maloláctica

Aunque en un proceso de vinificación normal, la FML suele desarrollarse sin problemas, hay que tener en consideración que el vino es un medio de cultivo pobre y selectivo y el restringido número de especies de bacterias lácticas allí presentes, se desarrolla bajo restricciones nutricionales, físicas y

químicas, por lo que siempre existen ciertos riesgos en el proceso (Ribéreau-Gayon et al., 1998; Lonvaud-Funel, 1999).

Los mecanismos para estimular la FML y evitar al mismo tiempo efectos secundarios indeseados, se basan principalmente en la selección y el control de las condiciones que mejor favorezcan el crecimiento de la microbiota láctica autóctona, en especial el pH, la concentración de SO₂, la temperatura, la realización de trasiegos retrasados y el grado alcohólico (Wibowo et al., 1985; García et al., 1992; Costello, 1993).

Además, es relativamente frecuente la utilización de nutrientes o compuestos activadores, constituidos por levaduras inactivas y sustancias como la celulosa o la caseína, que, además de ser un suministro de aminoácidos y vitaminas, actúan adsorbiendo sustancias inhibitoras del crecimiento formadas por las levaduras.

La duración de la FML es muy variable, si bien el tiempo más habitual oscila entre una y dos semanas, aunque en ocasiones puede durar meses, especialmente cuando las condiciones de temperatura y de pH no son las más adecuadas.

El final de la FML es también una etapa que debe ser minuciosamente controlada ya que cuando el ácido málico desaparece, las bacterias lácticas pueden metabolizar el ácido cítrico, produciéndose la denominada “fermentación citro-acética” que origina notables cantidades de ácido acético. Para evitarla es conveniente trasegar y sulfitar el vino cuando quedan en torno a 0,5 g/L de ácido málico.

1.3.2.6. Efectos de la fermentación maloláctica en el vino

Entre las modificaciones químicas y organolépticas que ocurren en el vino durante la FML merecen ser destacadas:

- El descenso de la acidez total con una desaparición total o parcial del ácido málico, lo que ocasiona un cambio en las sensaciones gustativas que pasan de ásperas y astringentes a suaves y de gusto más vinoso (Peynaud,

1993; Liu, 2002). Se admite que la fermentación de 1 g/L de ácido málico hace bajar la acidez total en 0,4 g/L en H₂SO₄ (ó 0,6 g/L en ácido tartárico).

- El aumento de la acidez volátil, debido fundamentalmente a la degradación de ácido cítrico que se produce en la etapa final de la FML, cuando el ácido málico ha desaparecido casi por completo (Ribérerau-Gayon et al., 2003).

- La pérdida de la intensidad del color en los vinos tintos, producida por la decoloración de las antocianidinas y por el aumento del pH, así como por procesos de precipitación y copigmentación (Lonvaud-Funel, 1999).

- La modificación del aroma, debida principalmente al aumento de la concentración de algunos alcoholes superiores (isobutanol, 1-propanol, 1-butanol, alcohol isoamílico, etc.), ésteres (lactato de etilo, caproato de etilo, acetato isoamílico, etc.), ácidos (ácido acético, ácidos grasos, etc.) y otros compuestos como el diacetilo o el 2,3-butanodiol. Como consecuencia se produce una reducción de los aromas herbáceos y la mejora de las propiedades sensoriales y de la calidad de los vinos (Lonvaud-Funel, 1999; Ugliano et al., 2003; Pripis-Nicolau et al., 2004).

- La mejora del sabor, producida como consecuencia del descenso de la acidez y del reemplazo del ácido málico, que proporciona un sabor ácido de manzana verde no madura, por el ácido láctico, mucho más suave y menos agresivo. Los vinos pierden así su carácter ácido y herbáceo, adquiriendo un sabor más suave (Ribérerau-Gayon et al., 2003).

- La mayor estabilidad biológica, debida al empobrecimiento en nutrientes y factores de crecimiento, así como a una mayor presencia en el medio de inhibidores microbianos (bacteriocinas, ácidos orgánicos, etc.) (Leisner et al., 1996; Stiles y Holzapfel, 1997) que transmiten al vino cierta inmunidad frente a alteraciones producidas por otros microorganismos (Lonvaud-Funel, 1995).

1.3.2.7. Mecanismos de inducción de la fermentación maloláctica

Como indicábamos anteriormente, aunque es habitual que la FML ocurra de forma espontánea, puede también suceder que ésta tenga lugar de forma muy lenta o incluso que no ocurra, por diversos motivos. En este caso, es frecuente recurrir a diferentes mecanismos de inducción, al objeto de forzar el inicio y desarrollo de la misma. Entre ellos, cabe destacar la:

- **Adición de un vino en pleno proceso de FML o adición de lías sanas** de vinos que ya realizaron la FML, lo que permite incrementar la población de bacterias lácticas. Este procedimiento tiene el inconveniente de la posible transmisión y propagación de bacteriófagos.

Este método fue el más utilizado en la década de los setenta y de los ochenta, si bien a menudo hacían falta grandes volúmenes que no estaban disponibles en las bodegas (Castino et al., 1975) y además se desconocía tanto la población final de células como su estado fisiológico (Lafon-Lafourcade et al., 1983b).

- **Desacidificación química parcial** del vino con carbonato cálcico o bicarbonato potásico, proceso por el que se eleva el pH del mismo. Este procedimiento debe ir acompañado de un sulfitado ligero y de la utilización de una temperatura durante la fermentación que favorezca el crecimiento de las bacterias (Bordons, 2001).

- **Adición de inóculos (cultivos starter) de bacterias lácticas seleccionadas.** Estos cultivos son obtenidos industrialmente y pueden encontrarse en forma líquida, congelada o liofilizada, y preparados de forma sencilla para su adición al vino, bien tras un protocolo de aclimatación (Lafon-Lafourcade et al., 1983b) o por adición directa (Nielsen et al., 1996).

La utilización de cultivos iniciadores exige que se optimicen las condiciones higiénicas de elaboración en las bodegas, para minimizar la posibilidad de contaminación y garantizar que se impone la cepa inoculada (Delteil, 2001).

La inoculación con cultivos iniciadores preparados industrialmente tiene entre sus ventajas (Cavin et al., 1989):

- La posibilidad de tener un mejor control del proceso.
- La reducción de la duración del mismo.
- Evita alteraciones organolépticas. La inoculación de bacterias seleccionadas impide el desarrollo de otras que pudieran tener un efecto negativo sobre la calidad del vino, al actuar principalmente sobre la acidez volátil.
- Posibilita la obtención de un producto con características organolépticas determinadas.

La selección de las cepas que vayan a formar parte de un cultivo iniciador es un complejo proceso que requiere no sólo de un estudio ecológico de la fermentación espontánea, para conocer de forma minuciosa y a nivel de cepa la microbiota que participa en la misma, sino también de la caracterización tecnológica de las mismas, al objeto de seleccionar la cepa o cepas que muestren las mejores propiedades para su aplicación industrial. Es importante resaltar que las bacterias lácticas autóctonas serán siempre las más eficaces a la hora de efectuar la FML en un vino determinado, por ser las mejor adaptadas a las condiciones del medio, de ahí que el proceso de selección deba iniciarse con la caracterización de esta microbiota (Henick-Kling et al., 1998; Zapparoli et al., 2000; Gómez-Alegría et al., 2004; Coucheney et al., 2005; Solieri et al., 2010).

Entre los criterios más utilizados para la selección de los cultivos iniciadores se encuentran:

- La facilidad de obtención y la resistencia a la liofilización.
- La rapidez de desarrollo en el vino.
- El efecto sobre las cualidades organolépticas del vino.

Sin embargo, existen muchas otras propiedades de interés enológico como son la capacidad para producir diversas enzimas (α y β glucosidasa, xilosidasa, tanasa, antocianasa, etc.), la capacidad para crecer a bajas temperaturas o la incapacidad para producir aminas biógenas, que también deberían ser ensayadas.

En los últimos años, dos han sido las especies más utilizadas comercialmente como cultivos iniciadores, *O. oeni* y *L. plantarum*, en especial la primera de ellas.

Respecto al momento en que estos cultivos iniciadores deben añadirse al vino existen diversas opiniones. Así algunos autores (Beelman y Kunkee, 1985; Krieger, 2002; Jussier et al., 2006) recomiendan hacerlo al inicio de la vinificación, mediante un proceso de co-inoculación levadura-bacteria, ya que se observa una considerable reducción en la duración de la fermentación. Otros por el contrario, opinan que es mejor hacerlo durante la FOH, ya que de esta forma se consigue evitar la inhibición de las bacterias lácticas, producida por las elevadas concentraciones de etanol y los bajos contenidos en nutrientes. Además, en este momento del proceso, parte del SO₂ se encontraría asociado a los ácidos orgánicos producidos por las levaduras (Van Vuuren y Dicks, 1993) lo que permitiría un mejor crecimiento de las bacterias.

Un tercer grupo opina que hay que hacerlo una vez terminada la FOH, cuando los azúcares son ya residuales (Gallander, 1979; Ribéreau-Gayon et al., 1975 y 1985). A este respecto, Gallander (1979) y Lafon-Lafourcarde et al. (1983a) obtuvieron datos experimentales que mostraban un bajo rendimiento, tanto en biomasa como en consumo de ácido L-málico, cuando los cultivos iniciadores se añadían en las etapas tempranas de la vinificación, motivado por una concentración demasiado alta de SO₂, una excesiva competencia con las levaduras por los nutrientes disponibles y por la ausencia de compuestos derivados de la autólisis de las levaduras, utilizables para su crecimiento. Además, con la inoculación temprana de estas bacterias, parece existir un mayor riesgo de picado láctico, producido por la degradación bacteriana de los azúcares (Lafon-Lafourcarde et al., 1983a; Tenorio et al., 2004), o de alteraciones derivadas del metabolismo de otros compuestos, como los ácidos orgánicos o el glicerol.

Por estos motivos parece que se ha impuesto mayoritariamente la inoculación una vez finalizada la FOH.

Otras técnicas para la inducción de la FML aunque escasamente utilizadas son:

- **Utilización de biomasa fijada o inmovilizada**, que consiste en hacer circular el mosto o el vino lentamente a través de un lecho que contiene bacterias lácticas fijadas a un soporte, de tal manera que se produce una instantánea transformación del ácido málico.

Suárez e Íñigo (2004) describieron que la transformación maloláctica utilizando células inmovilizadas de *O. oeni*, alcanzaba el 70% después de diez minutos utilizando soluciones que contenían entre 2,25 y 4,5 g/L de ácido L-málico y un pH=5,6, porcentaje que se incrementaba hasta un 76%, con tratamientos de una hora cuando se utilizaba mosto de uva a pH 3,3. Agouridis et al. (2008) describieron una degradación de ácido málico de entre el 53,1% y el 67,4% utilizando células inmovilizadas de la cepa *O. oeni* ATCC 23279.

- **Adición directa de la enzima maloláctica**. La obtención de esta enzima purificada no presenta dificultades de índole técnica, pero su adición al mosto o al vino no siempre tiene garantías de éxito, pues las condiciones del medio son muy diferentes de las del interior celular de las bacterias.

Para dar solución a este problema se han realizado diversas investigaciones para proteger la enzima mediante la fijación o inmovilización en un soporte de diferente naturaleza. Formisyn et al. (1997) diseñaron un reactor de membrana que contenía la enzima maloláctica extraída de *O. oeni* y diferentes cofactores necesarios para la reacción, y obtuvieron un rendimiento de entre el 62 y el 75% en un período de aproximadamente una semana. La conversión incompleta fue atribuida a la inactivación de la enzima y a la inestabilidad del cofactor NAD, por el pH del vino.

El éxito de este mecanismo pasa pues por la identificación de una enzima maloláctica que sea más resistente a las condiciones del vino y por la mejora técnica del proceso (Matthews et al., 2004).

En opinión de algunos autores (Maicas, 2001), la utilización de un reactor con células o enzimas inmovilizadas, presenta ciertas ventajas frente a la desacidificación tradicional, entre ellas la de poder reutilizar los cultivos o enzimas, la de poder controlar la producción de productos secundarios y la posibilidad de inducir o detener la fermentación en el momento deseado.

Además de que la calidad sensorial del vino parece no verse afectada por esta tecnología.

1.4. EL SECTOR VITIVINÍCOLA EN ESPAÑA

El viñedo representa en España el tercer cultivo en superficie, tras los cereales y el olivar, teniendo una importancia capital desde el punto de vista económico y social.

Existe una cultura del vino que se ha venido desarrollando a lo largo de los siglos y prácticamente todas las regiones españolas son productoras de vino, con una riqueza en variedades de uva, tradiciones vinícolas y tipos de elaboración, impresionante.

La superficie de vid cultivada ha crecido de forma casi continuada, con sólo algunos periodos de recesión debidos posiblemente más a reajustes estadísticos que a una realidad, siendo la superficie actual de viñedo de 1,16 millones de hectáreas. España sigue siendo el país con mayor extensión de viñedo de la Unión Europea y del mundo. Representa un 30% de la superficie total de la UE, seguida por Francia e Italia con aproximadamente un 22% cada una, y un 15% de la superficie mundial (<http://www.winesfromspain.com>).

Desde los años sesenta, los métodos de elaboración y crianza de los vinos han experimentado en todo el mundo una evolución espectacular, introduciéndose nuevos conceptos como el control efectivo de las vendimias, la vigilancia de los aromas primarios del fruto o el orden y la higiene en la bodega, lo que ha ocasionado una importante mejora de los caldos obtenidos. La implantación y asimilación de estos nuevos métodos en España ha sido tal que actualmente muchas de las más modernas bodegas de Europa se encuentran en nuestro país.

La situación geográfica de España, las diferencias climáticas y la variedad de suelos, hacen de la península ibérica un lugar privilegiado para que se produzcan vinos de características muy distintas. Se cultiva viñedo en la totalidad de las 17 Comunidades Autónomas si bien, tanto por la extensión del cultivo, cerca de 600.000 hectáreas, como por la importancia de sus

producciones, es la región de Castilla-La Mancha la que se sitúa a la cabeza de las regiones vitivinícolas. Esta región representa el 50% del viñedo nacional, el 18% del viñedo europeo y cerca del 8% del viñedo mundial (<http://www.winesfromspain.com>).

De las cinco provincias que forman esta Comunidad, Ciudad Real es la que posee una mayor superficie de plantación de viñedo, con algo más de 180.000 hectáreas y Guadalajara la de menor, con algo más de 2.100 hectáreas. El 53% de las viñas se encuentran adscritas a alguna Denominación de Origen siendo la D.O. La Mancha la de mayor superficie, con algo más de 193.000 hectáreas de viñedo.

España cuenta con 73 zonas de producción de “Vinos de Calidad Producidos en Región Determinada (V.C.P.R.D.)”, de los cuales 5 son Vinos de Calidad, 4 Vinos de Pago y el resto Denominaciones de Origen que, siguiendo el modelo europeo de producción, mantienen un estricto control sobre la cantidad producida, las prácticas enológicas y la calidad de los vinos que se producen. Las primeras Denominaciones autorizadas datan de 1932, y fueron: Jerez-Xères-Sherry, Manzanilla de Sanlúcar de Barrameda, Málaga, Montilla-Moriles, Rioja, Tarragona, Priorato, Alella, Utiel-Requena, Valencia, Alicante, Ribeiro, Cariñena, Penedés, Condado de Huelva, Valdepeñas, La Mancha, Navarra y Rueda. Además, existen 42 clases de vinos de mesa con derecho a la mención tradicional de Vinos de la Tierra.

En todas las Comunidades Autónomas, excepto en Cantabria y Santander, existe alguna Denominación de Origen, y en algunas como La Rioja, País Vasco, Navarra o Cataluña, casi todo el vino que se produce está amparado por alguna Denominación de Origen.

Del total de la producción de vino en España, el 54,1% corresponde a vino de mesa, el 7,54 % son vinos de mesa con Indicación Geográfica y el 38,36% restante son Vinos de Calidad (V.C.P.R.D.). En la última cosecha, el 56,04% de los vinos producidos fueron vinos tintos y rosados y el 43,96% vinos blancos.

En cuanto a las variedades de uva, hay que indicar que en el 61,5% de la superficie cultivada se producen variedades blancas, sobre todo en las

Comunidades Autónomas de Castilla-La Mancha, Extremadura, Andalucía y Cataluña. En estas dos últimas también se utiliza este tipo de uva para la elaboración de vinos de licor y cavas. Entre las variedades blancas destacan por su volumen de producción la Viura y la Macabeo y entre las variedades tintas destaca la variedad Tempranillo. Junto a ellas, también se cultivan Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot, Garnacha, Monastrell, Petit Verdot, Moravia, Bobal, Sauvignon Blanc, Chardonnay, Moscatel, Verdejo, Airén, Albillo, Malvasía, Pedro Ximénez, Malvar y Torrontés.

1.5. LA VARIEDAD TEMPRANILLO

La Tempranillo o Cencibel es la variedad tinta con mayor importancia y extensión de cultivo de toda España (Gallego, 2005). Su nombre, diminutivo de “temprano”, hace referencia al hecho de que se trata de una variedad de ciclo más bien corto y, por ello, sensible a las heladas de primavera y a plagas de oídio, ácaros y polillas del racimo. Es de maduración temprana y si se realizan podas cortas presenta una buena fertilidad y buenos rendimientos.

Su carga polifenólica hace que admita muy bien la madera. Su acidez tiende a ser baja y su alta concentración en taninos es una de las razones de su buena conservación (Gallego, 2005).

En relación a la producción de Tempranillo, Clarke (2001) señalaba: “para obtener elegancia y acidez de la Tempranillo, se necesita de un clima fresco, pero para conseguir niveles altos de azúcar y las gruesas pieles que dan el color intenso, se necesita calor”. En España estos dos requisitos se dan de manera óptima en la Ribera del Duero, que posee un clima continental, donde la temperatura media en julio está alrededor de los 21,4 °C, aunque a mediodía en el valle inferior pueden alcanzarse los 40 °C, y por la noche experimenta un descenso respecto a la máxima del día, de hasta 16 °C. No obstante, es una de las pocas variedades que pueden adaptarse y prosperar en climas mediterráneos continentales (Robinson, 2006).

1.5.1. VÍNCULO CON EL MEDIO

1.5.1.1. Historia

Hasta hace poco tiempo, se pensaba que la uva Tempranillo estaba emparentada con la Pinot Noir, pero recientes estudios genéticos han descartado esta posibilidad.

Su gran sensibilidad a las enfermedades y a las plagas, particularmente a la filoxera, que devastó las vides en el siglo XIX, han motivado frecuentes injertos en la Tempranillo española, lo que ha dado lugar a un estilo de uva ligeramente diferente.

El cultivo español de *Vitis vinifera*, el antecesor común de la mayor parte de las vides que existen actualmente, comenzó con el asentamiento fenicio en las provincias del sur de la Península y pronto se extendió por toda España, aunque existen escasas referencias al nombre "Tempranillo", lo que puede deberse a que en muchos lugares se pensaba que era una uva diferente. Una referencia temprana a esta uva se encuentra en el "Libro de Alexandre" (s. XIII), refiriéndose a la región de Ribera del Duero, mencionando a las uvas castellanas con este nombre.

Hasta el siglo XVII, esta variedad se cultivó preferentemente en las provincias septentrionales de la España continental, donde eran más apropiadas al clima ligeramente más fresco y la región de La Rioja y Valdepeñas hicieron de la Tempranillo su variedad más importante, y aún hoy es la uva principal de sus vinos más destacados.

La uva fue llevada a América, posiblemente en semillas, en el s. XVII por los colonizadores españoles, donde ha mantenido su identidad genética hasta hoy (Martínez et al., 2003). En 1905, Frederick Bioletti la llevó a California donde tuvo dificultades para implantarse por el clima caliente y seco, pero años más tarde, durante los 80, comenzó a florecer la producción de vino californiano de uva Tempranillo, después de que la variedad se estableciera en lugares montañosos adecuados.

A pesar de su aparente fragilidad, la Tempranillo ha viajado ampliamente durante el último siglo, y después de mucho ensayo y error, se ha establecido en un sorprendente número de países por todo el mundo.

La uva Tempranillo está actualmente disfrutando de un renacimiento, en parte como resultado de los esfuerzos de los cultivadores españoles que han demostrado que es posible producir vinos de gran carácter y calidad, incluso fuera de la región riojana.

1.5.1.2. Extensión

La Tempranillo es la uva española por excelencia y la más conocida fuera de España. Se considera originaria del norte de España, en concreto de La Rioja, y su cultivo se encuentra extendido por prácticamente todo el territorio nacional. Según la Orden APA/1819/2007, por la que se actualiza el anexo V, (Clasificación de las variedades de vid), del Real Decreto 1472/2000, de 4 de agosto, que regula el potencial de producción vitícola, la Tempranillo, con sus diferentes denominaciones, es la variedad recomendada en las Comunidades Autónomas de Murcia (Cencibel), Navarra, País Vasco, La Rioja, Comunidad Valenciana (Cencibel, Tinto Fino), Cataluña (Ull de Llebre), Extremadura (Cencibel, Tinto Fino), Madrid (Cencibel, Tinto Fino), Aragón (Cencibel), Castilla-La Mancha (Cencibel) y Castilla y León (Tinto Fino, Tinto del país, Tinta de Toro). Está autorizada en Andalucía, Baleares, Canarias, Cantabria (Tinto de Toro) y Galicia.

Las dos regiones más importantes en el cultivo de Tempranillo son La Rioja y Ribera del Duero seguidas de El Penedés, Navarra y Valdepeñas, donde se cultivan cantidades significativas. En las restantes Denominaciones de Origen está también presente pero en mucha menor cantidad. La uva Tempranillo es el principal componente de los vinos de La Rioja mezclada con Garnacha, Mazuelo y Graciano y constituye entre el 90 y el 100% de los vinos de la Ribera del Duero.

Fuera de España, tiene un importante papel en la producción de vinos en dos regiones de Portugal, el Alentejo Central y Douro, donde es conocida con otros nombres. En Sudamérica, se cultiva ampliamente en Argentina, Chile

y México y también hay algunas plantaciones en la República Dominicana. En América del Norte se cultiva en California, Oregón y Nuevo México. También se cultiva en algunas regiones vinícolas australianas, incluyendo el Valle McLaren, las Colinas de Adelaida y la región Geopraphe de Australia Occidental.

1.5.2. CARACTERÍSTICAS DE LA UVA TEMPRANILLO

La Tempranillo es una uva tinta de piel gruesa (Figura 11) que crece mejor en altitudes relativamente elevadas, pero que puede también tolerar climas mucho más templados. Los racimos tienen forma cilíndrica y son compactos. Las bayas son esféricas, de color negro púrpura con pulpa incolora. La piel no presenta ningún carácter herbáceo.



Figura 11. Uva Tempranillo.

Como ya hemos indicado, es muy sensible a plagas y enfermedades y resiste poco las inclemencias del tiempo. Las bayas se contraen cuando hay sequía y se hinchan cuando hay demasiada humedad, lo que produce un efecto negativo en la calidad de los vinos, afectando al color. Los efectos de estas inclemencias se atenúan cuando el terreno es rico en piedra caliza, debido al efecto de la arcilla y a la humedad en las raíces, siendo más acusados en zonas arenosas y en viñas jóvenes, en las que las raíces son generalmente demasiado superficiales.

La raíz de la planta absorbe potasio con facilidad, lo que hace que en la madurez se alcancen pHs en torno a 3,6 en la pulpa y a 4,3 en la piel. Cuando absorbe demasiado potasio, el mosto es más salino, lo que hace más lenta la desaparición del ácido málico y como consecuencia el vino tiene un pH superior.

La uva Tempranillo produce un mosto equilibrado en azúcar, color y acidez, aunque esta última a veces es escasa.

La Tabla 6 muestra las características de algunos órganos de la planta.

Tabla 6. Características de la variedad Tempranillo (Gallego, 2005).

| | Caracteres | Definición |
|----------------------|------------------------------------|--|
| Pámpano joven | Pigmentación | Media, entre rosa y granate |
| | Densidad de pelos | Abundante |
| Pámpano | Porte | Semierguido |
| | Color de la cara dorsal entrenudos | Verde con rayas rojas |
| Zarcillos | Longitud | Largos, trifurcados |
| Hoja adulta | Tamaño | Grande |
| | Forma del limbo | Pentagonal, lobulado, bien definido y superpuesto |
| | Hinchazón del haz | Alabeado, verde intenso |
| | Forma y longitud de los dientes | Grandes, ligeramente convexos alternos |
| | Forma del seno peciolar | En V superpuesto |
| | Pecíolo, forma y color | Largo, cilíndrico, con rayas granates |
| | Pigmentación del envés | Nula |
| Racimo | Densidad de pelos entre nervios | Abundante, largos flexuosos con tendencia algodonosa |
| | Densidad de pelos en nervios | Casi nula |
| | Tamaño y compacidad | Mediano-grande |
| | Longitud del pedúnculo | Medio |
| Baya | Tamaño | Medio-pequeño |
| | Forma de perfil | Circular |
| | Ombigo | Esférico |
| | Grosor de la epidermis | Grueso |
| | Pigmentación de la pulpa | Nula, sólo pincel y pepitas |
| | Sabores particulares | Frutal-compota |
| | Facilidad separación del pedicelo | Difícil |
| | Formación de pepitas | Presente |
| | Color principal (sin pruina) | Azul negruzco |

1.5.3. LOS VINOS DE LA VARIEDAD TEMPRANILLO

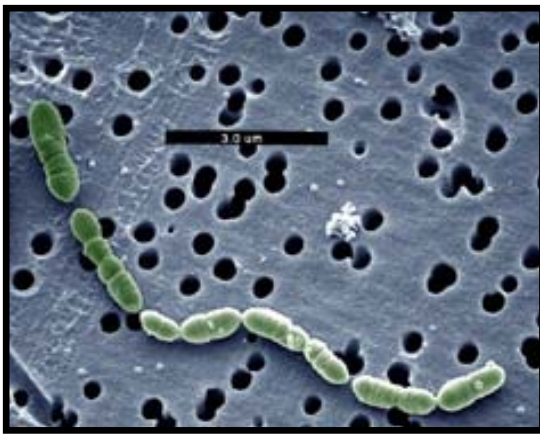
El vino Tempranillo si bien se usa habitualmente en mezclas, es frecuente que constituya hasta un 90% de las mismas. Por su baja acidez y bajo contenido en azúcar, suele mezclarse con Garnacha, Mazuela, Graciano, Merlot y Cabernet Sauvignon, aunque esto depende de las regiones. Menos frecuentemente se embotella como vino varietal.

Los vinos Tempranillo tienen un intenso color rojo rubí (Figura 12), con aromas de bayas, ciruelo, tabaco, vainilla, cuero y hierba. Poseen un paladar franco, interesante en vino joven, que se vuelve aterciopelado cuando se envejecen.



Figura 12. Vino varietal Tempranillo

Pueden consumirse jóvenes o envejecidos durante varios años en barrica de roble, siendo la FML un proceso esencial para la obtención de vinos de gran calidad. El papel de la FML en los vinos tintos es más que la simple desacidificación, ya que el potencial metabólico de las bacterias lácticas participantes en esta etapa, es diverso y complejo, produciéndose importantes cambios en las características y en la calidad del vino como consecuencia de los procesos bioquímicos que ocurren, cambios que dependen tanto de las bacterias lácticas participantes como del tipo de vino.



Oenococcus

2. Objetivos y plan de trabajo

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

La fermentación maloláctica es una etapa importante en la vinificación de los vinos tintos en la que participan diferentes especies de bacterias lácticas, siendo *Oenococcus oeni* la más abundante por ser la mejor adaptada a las condiciones del medio (Pozo Bayón et al., 2005).

Tradicionalmente, las bodegas dejaban que ésta ocurriera de forma espontánea, como consecuencia del crecimiento de las bacterias lácticas procedentes de la microbiota indígena, aportada por la uva o “residente” en las bodegas, y aún hoy se procede de esta forma en muchas ocasiones. No obstante, la tendencia actual se dirige a la utilización de cultivos iniciadores constituidos por cepas de *Oenococcus* seleccionadas.

La utilización de estos cultivos iniciadores favorece el inicio de la fermentación maloláctica y permite un mejor control de la misma, evitando los problemas que un proceso incontrolado puede ocasionar como por ejemplo el picado láctico, el aumento de la acidez volátil de los vinos, la producción de aminas biógenas, etc., riesgos todos ellos que suponen un alto coste económico para el sector vitivinícola. Otras importantes ventajas de la utilización de estos cultivos iniciadores son la obtención de vinos higiénicos (Palacios et al., 2003) y la posibilidad de trabajar a temperaturas más bajas, lo que influye en la calidad de los vinos además de que supone un importante ahorro para las bodegas.

La obtención de estos cultivos iniciadores requiere de un profundo conocimiento de la microbiota que participa en los procesos espontáneos, ya que al objeto de mantener las características de identidad de los vinos elaborados en las distintas regiones vitivinícolas, es aconsejable que en éstos se utilicen cepas autóctonas que muestren buenas propiedades tecnológicas.

El objetivo de esta Tesis Doctoral es el estudio de la biodiversidad de la microbiota láctica presente en la fermentación maloláctica espontánea de vinos tintos de la variedad Tempranillo elaborados en bodegas de Castilla-La Mancha con el fin de seleccionar aquellas cepas autóctonas que presenten las mejores propiedades para ser utilizadas como cultivos iniciadores.

Para ello se han planteado los siguientes objetivos parciales:

1. El **estudio de la diversidad genética** de las especies de bacterias lácticas presentes en la fermentación maloláctica espontánea de vinos tintos de la variedad Tempranillo.
2. La **caracterización tecnológica de las cepas identificadas** y la **selección** de aquellas que presenten las mejores propiedades.
3. El **estudio del comportamiento de las cepas seleccionadas y de su capacidad de implantación** a escala semi-industrial.

Para ello, el **plan de trabajo** a seguir es el siguiente:

- 1) Toma de muestras de vinos Tempranillo, elaborados en diferentes bodegas de Castilla-La Mancha, en diferentes etapas de la fermentación maloláctica y en dos vendimias consecutivas.

Se pretende con ello ampliar el número de aislados objeto de estudio y conocer si existe de una microbiota adaptada a las condiciones de elaboración.

- 2) Obtención y purificación de aislados mediante siembra en placas de medios de cultivo adecuados para el crecimiento de las bacterias lácticas.
- 3) Caracterización genética (genotipado) de las cepas aisladas. Para ello se ensayarán diferentes técnicas moleculares, la RAPD, la PFGE y la DD-PCR, al objeto de seleccionar aquella que muestre mayor capacidad discriminante.
- 4) Identificación de las cepas para lo que se utilizaran tanto técnicas moleculares (PCR específicas) como métodos fenotípicos convencionales (tiras API).
- 5) Caracterización tecnológica de las cepas. Se ensayaran propiedades de interés enológico como la presencia de actividades enzimáticas, la capacidad de producir aminos biógenos o la resistencia a la liofilización, entre otras, seleccionándose aquellas cepas que presenten las mejores propiedades.

- 6) Ensayos de microvinificación a escala semi-industrial para conocer el comportamiento de las cepas seleccionadas y su capacidad de implantación en condiciones reales.

Asimismo, y para tener un conocimiento más completo del proceso microbiológico que ocurre en la fermentación maloláctica espontánea, se prevé realizar un

- 7) Estudio complementario para conocer la presencia de otros grupos bacterianos, utilizando métodos independientes de cultivo.

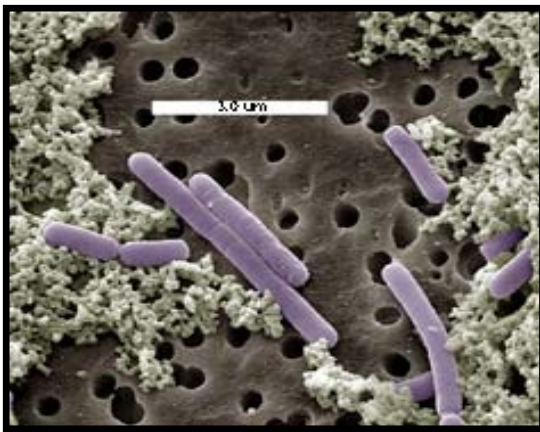
Este estudio forma parte de dos proyectos de investigación que fueron subvencionados por la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha y por el Ministerio de Educación y Ciencia, titulados “Estudio de la biodiversidad de la microbiota láctica presente en la fermentación maloláctica de vinos tintos elaborados en bodegas de Castilla-La Mancha: caracterización molecular y tecnológica para la selección de cepas” y “Biodiversidad de la microbiota láctica presente en la fermentación maloláctica de vinos tintos Cencibel elaborados en Castilla-La Mancha en dos vendimias consecutivas”, respectivamente.

Estos proyectos han sido realizados en coordinación con un grupo de investigadores del Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha (IVICAM), habiendo contado con la inestimable colaboración de las siguientes bodegas:

- Bodega Dehesa del Carrizal
- Bodegas Illana
- Bodegas La Cerca
- Bodegas Lozano
- Bodegas y Viñedos Muñoz
- Cooperativa Virgen de las Viñas
- Cooperativa El Progreso
- Finca Marisánchez
- S.A.T. Videma
- Viñedos y Bodegas González

Así como de la

- Empresa Danstar Ferment A.G.



Lactobacillus

3. Resultados

3.1. RELACIÓN DE PUBLICACIONES

Para la presentación de las metodologías utilizadas y de los resultados obtenidos en este estudio se relacionan y adjuntan las publicaciones a las que ha dado lugar:

En revistas internacionales:

- I. Ruiz, P., Izquierdo, P.M., Seseña, S. y Palop, M.LI. 2008. Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiol.* 25, 942-948.
- II. Izquierdo, P.M., Ruiz, P., Seseña, S. y Palop, M.LI. 2009. Ecological study of lactic acid microbiota isolated from Tempranillo wines of Castilla-La Mancha. *J. Biosci. Bioeng.* 108, 220-224.
- III. Ruiz, P., Izquierdo, P.M., Seseña, S. y Palop, M.LI. 2010. Analysis of lactic acid bacteria populations during spontaneous malolactic fermentation of Tempranillo wines at five wineries during two consecutive vintages. *Food Control* 21, 70-75.
- IV. Ruiz, P., Izquierdo, P.M., Seseña, S. y Palop, M.LI. 2009. Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results. *Int. J. Food Microbiol.* doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.027.
- V. Izquierdo, P.M., Gómez, S., Ruiz, P., Seseña, S., García, E. y Palop, M.LI. 2009. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* isolates from malolactic fermentation of Tempranillo wine. *J. Food Protect.* 72, 907-910.
- VI. Ruiz, P., Izquierdo, P.M., Seseña, S. y Palop, M.LI. Colonizing ability of a selected autochthonous strain of *Oenococcus oeni* (En preparación).
- VII. Ruiz, P., Seseña, S., Izquierdo, P.M. y Palop, M.LI. Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a culture-independent method (PCR-DGGE). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (En revisión).

En revistas nacionales:

- VIII. Izquierdo, P.M., Seseña, S., Ruiz, P. y Palop M.LI. 2007. Producción de acidez volátil y degradación de ácido cítrico por cepas de *Oenococcus oeni* aisladas de la fermentación maloláctica espontánea de vinos Cencibel elaborados en Castilla-La Mancha. *Vitic. Enol. Prof.* 111, 37-42.

El orden de presentación de las mismas atiende al establecido en los objetivos planteados en el apartado anterior.



**Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from
malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from
combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns**

Ruiz, P., Izquierdo, P.M., Seseña, S. y Palop, M.LI.

Food Microbiol. 25, 942-948



Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns

Patricia Ruiz^a, Pedro Miguel Izquierdo^b, Susana Seseña^{a,*}, M. Llanos Palop^a

^a Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Universidad de Castilla-La Mancha, Avda. Carlos III s/n, 45071 Toledo, Spain

^b Instituto de la Vid y del Vino de Castilla-La Mancha, Crta. Toledo-Albacete s/n, 13700 Tomelloso (Ciudad Real), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 November 2007

Received in revised form

23 June 2008

Accepted 25 June 2008

Available online 27 June 2008

Keywords:

Cencibel wines

Malolactic fermentation

Oenococcus oeni

RAPD-PCR

PFGE

ABSTRACT

Three molecular techniques, randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR), pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and differential display-polymerase chain reaction (DD-PCR) have been used to assess the intraspecific diversity of the lactic microbiota responsible for spontaneous malolactic fermentation (MLF) in Cencibel wines made at a cellar in Castilla-La Mancha (Spain). The results indicate that RAPD-PCR and PFGE are of value in typing this microbiota. Better discrimination was achieved by RAPD-PCR. Reproducibility using DD-PCR was not good, which makes this method unsuitable. Combined numerical analysis of the patterns obtained from RAPD-PCR and PFGE allowed a better discrimination; this would therefore be a suitable tool to discriminate the diversity of bacterial communities like those found in MLF of wines.

Genetic diversity data from combined numerical analysis suggest that there is considerable microbial diversity within MLF of Cencibel wines, with some genotypes coinciding in the two vinifications analysed.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Malolactic fermentation (MLF) is a bacterial process that usually occurs once alcoholic fermentation by yeast is complete. Some species of lactic acid bacteria have been reported to be responsible for this process (Pozo-Bayón et al., 2005), the most frequently isolated species being *Oenococcus oeni*. Wines are deacidified through decarboxylation of the L-malic acid to L-lactic acid, which helps enhance microbial stability and flavour complexity (Davis et al., 1985; Kunkee, 1991). This positive contribution of MLF to wine characteristics and the need to achieve better control of the process have led wineries to use starter cultures composed of selected strains of *O. oeni*.

The development of starter cultures for food fermentations is a multidisciplinary endeavour requiring not only an ecological study of the spontaneous process but also characterization of useful technological and physiological features of the predominant strains in order to select those with the highest potential for industrial applications. Intraspecific differentiation is therefore a required preliminary step for the selection of strains because

technological characteristics, such as survival in wines, the rate of L-malic acid consumption or the production of enzymatic activities, are reported to be strain dependent (Zapparoli et al., 2000; Gómez-Alegría et al., 2004; Coucheney et al., 2005). A reliable method with good discriminating capacity, accuracy and reproducibility, like those based on the genetic characterization of strains, will therefore be needed to carry out these studies.

O. oeni has been described as a genomically and phylogenetically homogeneous species (Farrow et al., 1989; Dicks et al., 1990; Zavaleta et al., 1996; Le Jeune and Lonvaud-Funel, 1997), and hence the differentiation of strains can be achieved only by high-resolution methods such as those based on DNA analysis. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of macrorestriction fragments are the most frequently used (Tenreiro et al., 1994; Viti et al., 1996; Zavaleta et al., 1997; Zapparoli et al., 2000; Guerrini et al., 2003), and more recently Lechiancole et al. (2006) described the utilization of a PCR-based method targeting RNA—differential display PCR (DD-PCR)—for characterization of oenococcal strains.

In addition, some researchers (Dykes and Von Holy, 1994; Nigatu, 2000) have suggested that the basic methodological differences underlying some of these methodologies may lead to discrepancies in typing results and that only the combination of results from different techniques is capable of providing a

* Corresponding author. Tel.: +34 925 265 716; fax: +34 925 268 840.

E-mail address: susana.sprieto@uclm.es (S. Seseña).

complete picture, especially when the ecology of natural microbial populations is being studied. Our results in a previous study to characterize *Lactobacillus* strains (Sánchez et al., 2004) confirmed this fact, and better discrimination was achieved when combined numerical analysis of patterns obtained from RAPD-PCR and PFGE was used. To our knowledge combined numerical analysis of different techniques has never been used before to study genetic diversity of *O. oeni* strains.

The aim of this research is to assess the genetic diversity of the lactic microbiota responsible for spontaneous MLF in Cencibel wines made at a cellar in Castilla-La Mancha (Spain), using an approach based on combined numerical analysis of results from three molecular techniques: RAPD-PCR, PFGE and DD-PCR.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

Samples of Cencibel wine from two vinifications (D1 and D2) during the 2005 vintage were taken at a cellar in Castilla-La Mancha. The winemaking process involves manual harvesting of grapes followed by vinification practices typical of this specific wine-producing area, mainly consisting in controlled alcoholic fermentation at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ using the commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* Uvaferm VN (Lallemand, SA, Toulouse, France). Wines are then transferred to tanks until spontaneous MLF occurs. The sampled cellar had never used commercial starters for MLF. One 10,000 l fermentation tank was sampled each time. Two samples were collected from each stage, one for chemical analysis and the other for microbiological analysis.

Samples were collected aseptically at the end of alcoholic fermentation (stage 0) and at the middle and end of MLF (stages 1 and 2, respectively). The criteria for defining the middle and end of MLF were based on the analyses of the L-malic acid content of the wines. Samples were kept refrigerated until analysis.

2.2. Chemical analysis

The chemical parameters determined were L-malic acid and L-lactic acid, pH, total acidity determined as tartaric acid content, volatile acidity and free and total SO_2 content. Alcohol content was determined only in stage 0 samples. The procedures described in the Official Methods of Wine Analysis (European Union, 1990) were followed in all cases. Analyses were performed in duplicate.

2.3. Isolation of LAB

Wine samples were diluted in sterile saline solution and plated on MLOA (agar medium specific for *O. oeni*) with tomato juice ($10\% \text{ v v}^{-1}$) (Scharlab, Barcelona, Spain) and MRSA (Man, Rogosa and Sharpe Agar) (Scharlab), both supplemented with sodium azide (50 mg ml^{-1}) and cycloheximide (100 mg ml^{-1}) to suppress yeast and acetic bacteria growth. MLOA and MRSA plates were incubated anaerobically (Gas Pack System, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) at 30°C for 5 and 2 days, respectively. Counts were expressed as log of colony forming units (cfu) per ml of wine. At each stage, five isolated colonies from countable plates from both media were randomly picked and propagated on plates until purification. Pure cultures were stored at -80°C with $20\% (\text{v v}^{-1})$ glycerol (Panreac, Barcelona, Spain). Isolates were sub-cultured after 6 months.

2.4. Identification of isolates

2.4.1. Amplification and restriction analysis of 16S-rRNA gene (16S-ARDRA)

The procedure described by Rodas et al. (2003) was used. A colony was suspended in $10 \mu\text{l}$ sterile milli-Q water and $1 \mu\text{l}$ of the suspension used for PCR reactions. Restriction of the amplified fragment was carried out overnight at 37°C in $20 \mu\text{l}$ of incubation buffer containing 5 U of the restriction enzyme *MseI* (New England BioLabs, Ipswich, UK) and enough PCR product to give 500 ng DNA ($2\text{--}10 \mu\text{l}$). Restriction fragment patterns were analysed in $2\% (\text{w v}^{-1})$ agarose in $1 \times \text{TBE}$ gels using 100 bp ladder (Biotools, Madrid, Spain) as a molecular size marker. A 90 V constant voltage was used in the electrophoresis.

The reference strains were *O. oeni* 217 and *O. oeni* 4028 from the Spanish-type culture collection (CECT).

2.4.2. Phenotypic identification

Isolates showing 16S-ARDRA patterns different from that of *O. oeni* were phenotypically identified by API 50CH galleries (API System, BioMerioux, Marcy l'Etoile, France). The Apilab Plus computer-assisted identification programme (version 4.0) was used to analyse the carbohydrate fermentation profiles.

2.5. Strain typing

2.5.1. RAPD-PCR analysis

Genomic DNA was obtained as described for 16S-ARDRA. RAPD-PCR was carried out following the procedure described by Sánchez et al. (2004). M14 ($5'\text{-GAGGGTGGGGCCGTT-3'}$) and M13 ($5'\text{-GAGGGTGGCGTTCT-3'}$) primers were used, both supplied by Bonsai Technologies Group (Madrid, Spain). RAPD-PCR reactions were performed in a total volume of $20 \mu\text{l}$ and amplification was carried out using a 2400 Perkin Elmer thermal cycler (Perkin Elmer Co., USA).

Amplified products were resolved by electrophoresis (50 A for 3 h , without cooling) on $1.5\% (\text{w v}^{-1})$ agarose in $1 \times \text{TBE}$ buffer gels, stained with ethidium bromide and photographed with a Kodak DC290 Digital Camera. 100 bp ladder (Biotools) was used as a DNA molecular weight marker and as a normalization reference.

2.5.2. PFGE analysis

2.5.2.1. DNA preparation. Intact genomic DNA was prepared following a modified version of the method described by Sánchez et al. (2004). Cells from 10 ml of culture on MLO broth were harvested by centrifugation, washed once in $1 \times \text{TE}$ (12 g l^{-1} Tris; 4 g l^{-1} EDTA; pH 8) and resuspended in T100E (1.21 g l^{-1} Tris; 37.22 g l^{-1} EDTA; pH 7.5). The cell suspensions were heated at 50°C and mixed with an equal volume of a $1\% (\text{w v}^{-1})$ molecular biology certified low melting point agarose (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) in $1 \times \text{TE}$ buffer, and the mixture was allowed to solidify in special moulds ($10 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 1.5 \text{ mm}$). The agarose-cell mixture set within each mould was referred to as a plug. The embedded cells were lysed *in situ* by immersing the plugs in 3 ml of lysis buffer [$1 \times \text{T100E}$; 0.7 mg ml^{-1} lysozyme (Sigma-Aldrich)] and incubating at 37°C for 4 h . The plugs were then shaken overnight at 37°C in TESP buffer (1.2 g l^{-1} Tris; 167.5 g l^{-1} EDTA; 10 g l^{-1} sarcosyl; pH 8.1) containing 100 mg ml^{-1} pronase (Protease Típe XIV Bacterial from *Streptomyces griseus*; Sigma-Aldrich). Afterwards the plugs were washed five times in $1 \times \text{TE}$ buffer with gentle shaking for 30 min per wash.

2.5.2.2. Digestion in situ of DNA. Slices ($1\text{--}2 \text{ mm}$) from the plugs were washed once in $1 \times \text{TE}$ prior to incubation with 30 U of *Apal*

(Roche, Penzberg, Germany) or 30 U *Sfi*I (New England BioLabs) for 4 h at 28 and 50 °C, respectively.

2.5.2.3. PFGE. Slices were loaded directly into wells of 1% (w/v) PFGE certified agarose (Bio-Rad) in 0.25 × TBE buffer, gels. DNA fragments were resolved by pulsed-field electrophoresis in a CHEF DRIII apparatus (Bio-Rad) at 14 °C and 6 V cm⁻¹. Different linear ramped pulse times and total run times were selected for optimal separation of fragments. *Apal* restriction fragments were resolved by applying three run steps (6 h with a pulse ramping between 3 and 5 s, 6 h with a pulse ramping between 2 and 3 s, and 5 h with a pulse ramping between 0.5 and 1 s). A single run step (21 h with a pulse ramping between 1 and 50 s) was used to separate *Sfi*I restriction fragments. Gels were stained with ethidium bromide (0.5 µg ml⁻¹). The low range PFGE Marker (2.03 and 194.0 kb) (New England BioLabs) was used as a size marker and normalization reference.

2.5.3. DD-PCR analysis

RNA was isolated from 5 ml of culture on MLO broth as described by Lechiancole et al. (2006), using an RNA isolation kit (RNasy Mini Kit) supplied by Izasa (Barcelona, Spain). The quality of the RNA samples was verified on 1.2% (w v⁻¹) agarose gels and the concentration was determined by measuring the absorbance at 260 nm.

Extracts were treated with DNaseI (Roche); after that, cDNA was synthesized using 6 µg of RNA, the M-MLV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Barcelona, Spain) and degenerated oligonucleotides. Three microlitres of the first-strand cDNA synthesis reaction were used as a template for DD-PCR amplifications. The amplification conditions were as described for RAPD-PCR using M13 primer. DD-PCR products were resolved by electrophoresis, as described for RAPD-PCR.

2.6. Reproducibility study

A reproducibility study for each of the techniques (RAPD-PCR, PFGE and DD-PCR) was carried out on four isolates and four iterations of the entire procedure to determine the minimum percentage similarity necessary for strain discrimination. Four separate cultures of each isolate were grown and a total of four reactions per strain were carried out. The products obtained for two replicates of each isolate were run on one gel, and those for the other two replicates were run on another gel. Patterns were analysed as described below and the level of similarity observed between repeats established a discrimination threshold below which patterns were deemed different.

2.7. Numerical analysis of RAPD-PCR, PFGE and DD-PCR patterns

RAPD-PCR, PFGE and DD-PCR gels were visualized by UV transillumination at 254 nm and photographed with a KODAK DC290 zoom digital camera. The patterns were normalized and further processed with GelCompar version 2.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) (Vauterin and Vauterin, 1992). Isolates were grouped using the Pearson product-moment correlation coefficient (*r*) and cluster analysis by unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA). Clusters obtained from analysis of patterns from different techniques were identified by the letters R (RAPD-PCR) and P (PFGE).

2.8. Combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns

RAPD-PCR and PFGE patterns were combined and analysed numerically using GelCompar version 2.5 as mentioned above. The resulting groups in the consensus dendrogram may be regarded as the best compromise with the fewest discrepancies using the available data. A consensus dendrogram was constructed from the dendrograms obtained in the reproducibility studies for both methods, and as before, the minimum similarity value (*r* × 100) observed between repeats was taken as the discrimination threshold. Clusters from consensus dendrogram were identified by the letter C.

3. Results

Table 1 shows the mean values and the standard deviation obtained for the chemical parameters analysed in the wines. The trend for all parameters was usual for the process and no significant differences were found between vinifications.

Counts were similar in both media, with values at the beginning of MLF around 3.6 × 10³ and 1.5 × 10² cfu ml⁻¹ for D1 and D2 vinifications, respectively; these increased to 10⁷ cfu ml⁻¹ during MLF (data not shown).

Sixty isolates (36 from vinification D1 and 24 from vinification D2) were obtained from countable plates and subjected to 16S-ARDRA analysis after purification. One hundred percent of isolates from vinification D2 and 96.7% from vinification D1 showed the pattern corresponding to *O. oeni* (Fig. 1). Non-*Oenococcus* isolates were from samples taken at the end of alcoholic fermentation and were identified by API strips as *Leuconostoc* (*Lc.*) *mesenteroides* (% Id = 99.9).

RAPD-PCR analysis of the 60 isolates using the primer M13 discriminated 20 different genotypes (R1–R20) defined at a minimum similarity level of 82%, the value determined in the reproducibility study (Fig. 2A). Eight major clusters grouping more

Table 1
Chemical analysis

| Vinification | D1 | | | D2 | | |
|---|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 | 2 |
| Stage | | | | | | |
| L-malic acid (g l ⁻¹) | 1.85 ± 0.04 | 0.44 ± 0.01 | 0.13 ± 0.04 | 1.94 ± 0.01 | 0.82 ± 0.08 | 0.34 ± 0.01 |
| L-lactic acid (g l ⁻¹) | 0.15 ± 0.02 | 1.06 ± 0.08 | 1.07 ± 0.02 | 0.14 ± 0.08 | 1.08 ± 0.10 | 1.14 ± 0.04 |
| Alcohol content (% v v ⁻¹) | 13.82 ± 0.11 | | | 14.26 ± 0.04 | | |
| pH | 3.47 ± 0.04 | 3.49 ± 0.02 | 3.60 ± 0.04 | 3.37 ± 0.02 | 3.44 ± 0.03 | 3.51 ± 0.02 |
| Total acidity ^a | 7.13 ± 0.06 | 6.59 ± 0.01 | 6.39 ± 0.06 | 7.70 ± 0.01 | 7.65 ± 0.06 | 7.11 ± 0.09 |
| Volatile acidity ^b | 0.28 ± 0.01 | 0.30 ± 0.01 | 0.39 ± 0.01 | 0.20 ± 0.01 | 0.26 ± 0.01 | 0.27 ± 0.01 |
| Total SO ₂ (mg l ⁻¹) | 36.5 ± 2.12 | 33.5 ± 2.12 | 35.0 ± 1.41 | 39.0 ± 1.41 | 35.0 ± 1.41 | 33.5 ± 2.12 |
| Free SO ₂ (mg l ⁻¹) | 17.5 ± 2.12 | 14.5 ± 0.70 | 14.5 ± 0.70 | 21.0 ± 1.41 | 18.0 ± 1.41 | 17.0 ± 2.82 |

Data are the mean values ± standard deviation.

^a Tartaric acid (g l⁻¹).

^b Acetic acid (g l⁻¹).

than one isolate were obtained, with *Lc. mesenteroides* isolates grouped in genotype R6. Twelve isolates displayed singular RAPD-PCR patterns. Major clusters grouped isolates from both vinifications, which suggests that there is a microbiota well adapted to the elaborating conditions in the cellar. The primer M14 and combined analysis from patterns obtained with both primers did not discriminate the strains further.

Reproducibility of restriction patterns obtained for the same isolate by PFGE analysis was $\geq 83\%$. PFGE using the restriction enzyme *ApaI* showed less discrimination capacity than RAPD-PCR using primer M13, with the 60 isolates grouped in 10 genotypes (P1–P10) (Fig. 2B). Seven major clusters were obtained and only three *O. oeni* isolates displayed singular PFGE patterns. *Lc. mesenteroides* isolates were grouped with *O. oeni* isolates in genotypes P1 and P8, which clustered at an r value as low as 44%.

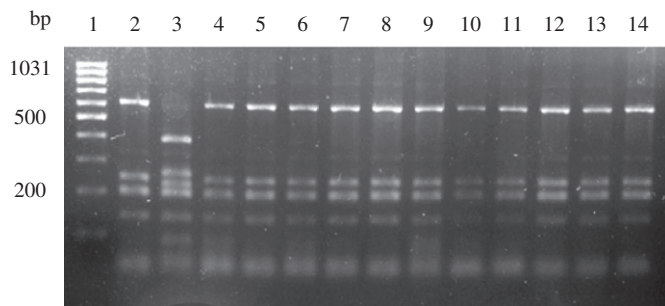


Fig. 1. 16S-ARDRA patterns obtained with *MseI*. Lane 1, molecular size marker (100 bp ladder, Biotools). Lane 2, *O. oeni* 4028. Lane 3, non-*Oenococcus* isolate. Lanes 4–14, *O. oeni* isolates.

Again, isolates from both vinifications were grouped in the same genotype. No further discrimination was achieved when endonuclease *SfiI* or combined analysis of patterns obtained with both enzymes were used (data not shown).

Results from the reproducibility study for M13 DD-PCR showed poor reproducibility for RNA samples from the same isolate, being the value for the coefficient of similarity obtained ($r = 23\%$) too low for this method to be considered for typing purposes. Fig. 3 shows M13 DD-PCR profiles obtained for some isolates in the reproducibility study. No further isolates were analysed by this method.

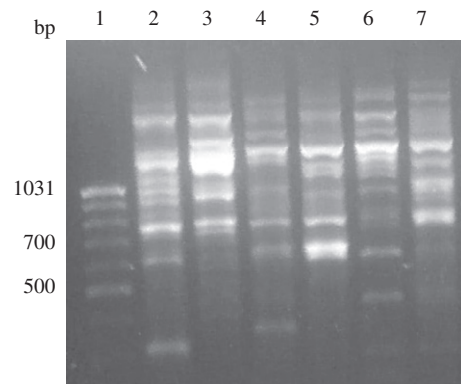


Fig. 3. M13 DD-PCR patterns. Lane 1, molecular size marker (100 bp ladder, Biotools). Lane 2, D12L10(1) isolate. Lane 3, D12L10(2) isolate. Lane 4, D21L4(1) isolate. Lane 5, D21L4(2) isolate. Lane 6, D22L5(1) isolate. Lane 7, D22L5(2) isolate.

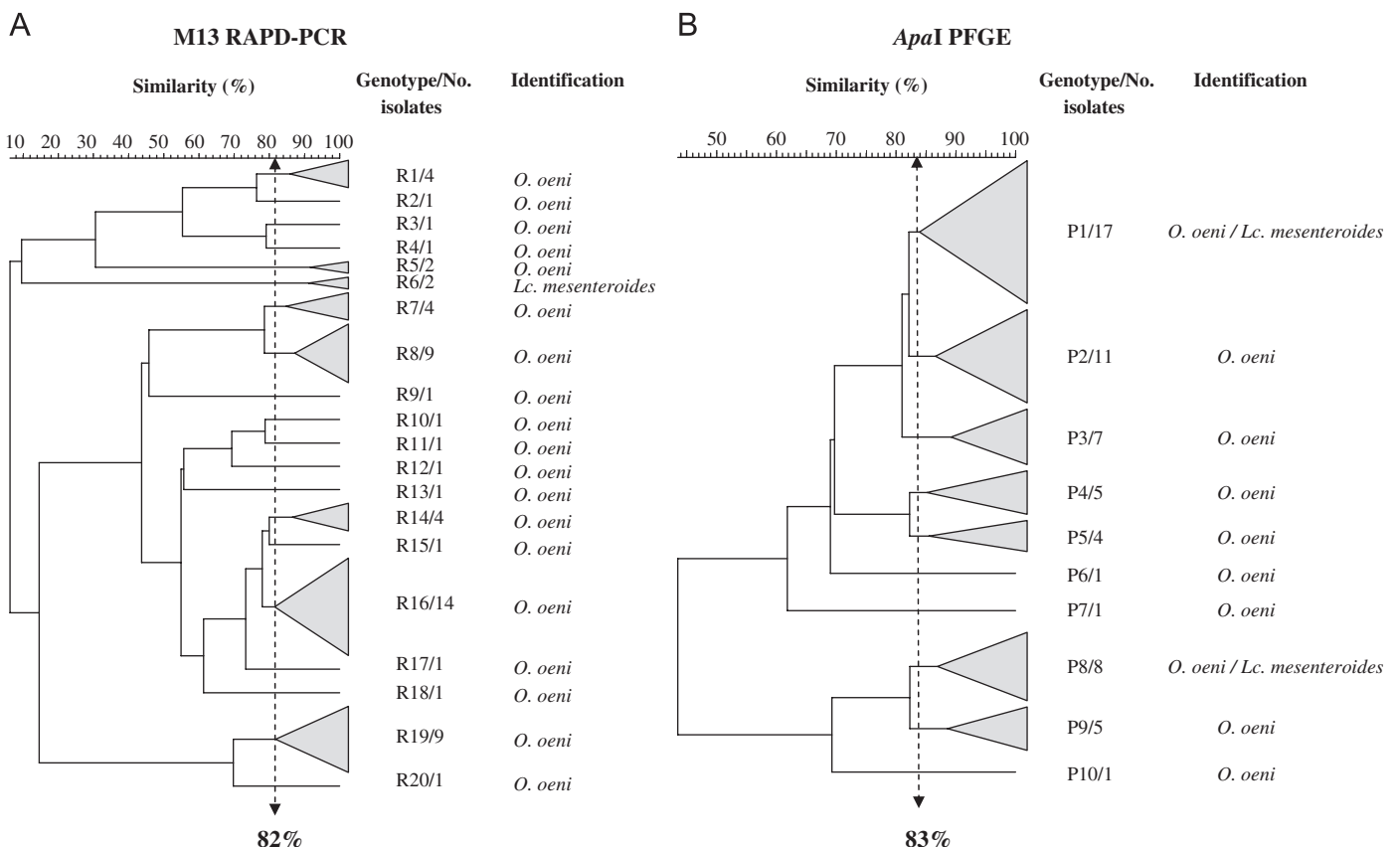


Fig. 2. Dendrograms obtained from UPGMA analysis of M13 RAPD-PCR (A) and *ApaI* PFGE (B) patterns. Scales indicates the similarity level (Pearson coefficient level $r \times 100$).

When the results from M13 RAPD-PCR and *Apal* PFGE analysis were combined and analysed numerically, the discriminating power was greater than with each method separately, as reflected by the 31 genotypes (C1–C31) at an *r* value of 82%, shown in the consensus dendrogram (Fig. 4). Fourteen major clusters were found, including from two to four isolates, and 17 isolates displaying singular patterns. Isolates clustered at genotype C12 were from samples taken during different stages of MLF. *Lc. mesenteroides* isolates were grouped in genotype C31.

When the presence in both vinifications of the genotypes obtained in the consensus dendrogram was analysed (Fig. 5), it was observed that seven (C8, C10, C11, C12, C14, C24 and C26) of the fourteen major genotypes were present in both vinifications, with genotypes C10 and C12 prevalent in vinification D1 and genotype C11 prevalent in vinification D2. It is important to highlight that isolates clustered in coincident genotypes (C8, C10, C11, C12, C14, C24 and C26) accounted for 43% and 57% of the microbiota participating in vinifications D1 and D2, respectively.

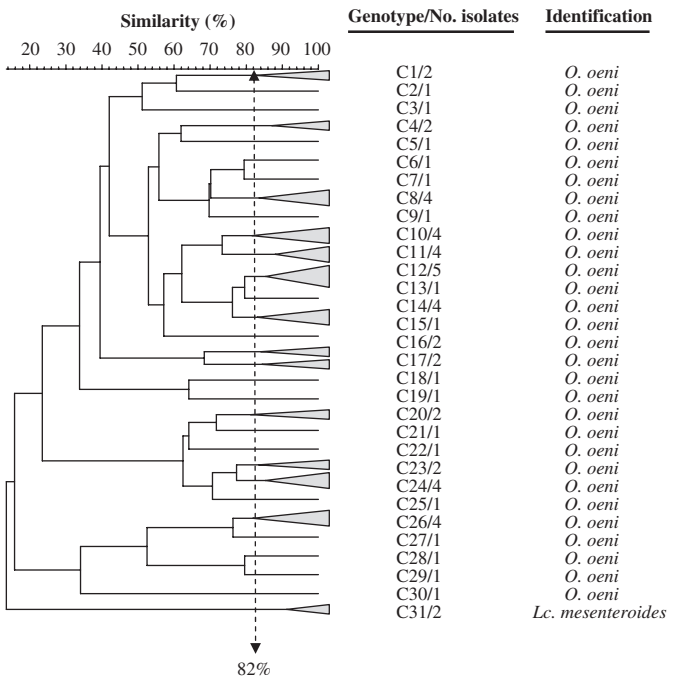


Fig. 4. Consensus dendrogram obtained combining M13 RAPD-PCR and *Apal* PFGE patterns.

Fig. 6 shows the frequency of isolation of the genotypes (%) throughout MLF, for each stage and from both vinifications. Differences were observed in the number of genotypes present at each stage of both vinifications; note also the simultaneous presence of a large number of genotypes, especially at stage 1 from both vinifications, coinciding with a major decrease in malic acid content. Some genotypes were present at more than one stage of both vinifications, but none was clearly predominant.

Table 2 summarizes the distribution of isolates in genotypes obtained from RAPD-PCR, PFGE and the combined analysis of both methods. There is an observable correspondence between isolates included in RAPD-PCR and PFGE genotypes and those obtained from the consensus dendrogram. Thus, for example, isolates included in genotype C26 were clustered by RAPD-PCR in genotype R1 and genotype C12 clustered isolates included by PFGE in genotype P2.

4. Discussion

The values recorded for chemical parameters analysed at each stage were similar to those reported by other authors for Cencibel wine (Izquierdo et al., 2000).

Lactic acid bacteria counts during MLF were similar to those reported by other authors (Ribéreau-Gayón et al., 1998a; Lonvaud-Funel, 1999); *O. oeni* and *Lc. mesenteroides* were able to grow on plates from both media, MRSA and MLOA.

As also reported by Rodas et al. (2003), with 16S-ARDRA using *Mse*I primer, most of the isolates obtained from MLF were identified rapidly and reliably at species level; also, *O. oeni* was the predominant species in this fermentation as reported by other authors (Coucheny et al., 2005; Renouf et al., 2007).

As regards the usefulness of the methods assayed in this study (RAPD-PCR, PFGE and DD-PCR) for typing lactic acid bacteria, there have been important discrepancies between authors. In agreement with our own results, Zapparoli et al. (2000) reported that PFGE analysis using the restriction enzyme *Apal* or *Sfi*I showed poorer discriminant capacity than RAPD-PCR, and that primer M13 was more discriminating than primer M14. In contrast, Lechiancole et al. (2006) were unable to discriminate the 39 *O. oeni* isolates obtained from Aglianico wines that were clustered in ten different genotypes by PFGE and the restriction enzyme *Apal* by means of RAPD-PCR, even using eight different primers. Kelly et al. (1993) also reported that PFGE was suitable for differentiation of *O. oeni* strains.

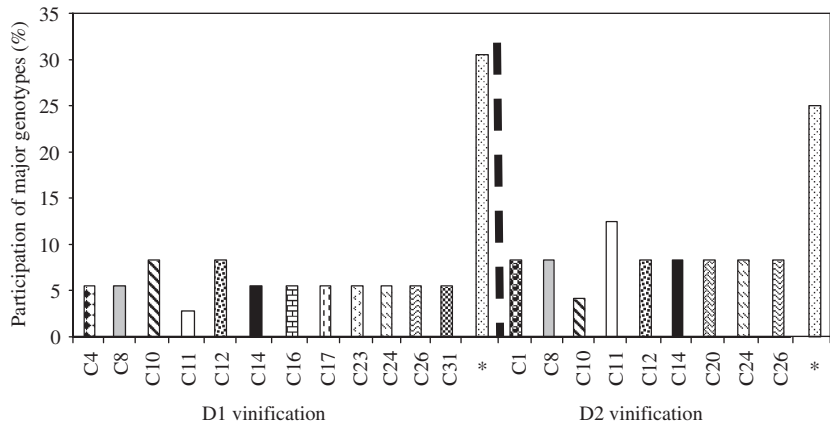


Fig. 5. Participation of the major genotypes obtained in the consensus dendrogram in both vinifications. *Genotypes present in each vinification in a percentage lower than 10% have been grouped.

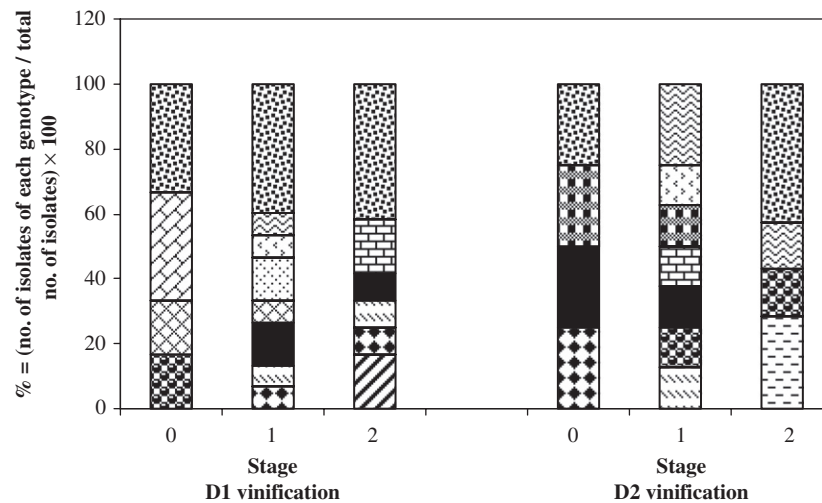


Fig. 6. Frequency of isolation of the genotypes (%) at each stage of MLF. Different shaded areas correspond to different genotypes. Genotypes comprising one isolate have been grouped.

Table 2
Distribution of isolates in RAPD-PCR, PFGE and combined analysis genotypes

| Isolate | Identification | RAPD-PCR | PFGE | Consensus |
|---------|--------------------------|----------|------|-----------|
| D12L7 | <i>O. oeni</i> | R1 | P2 | C26 |
| D23L3 | <i>O. oeni</i> | R1 | P1 | C26 |
| D23L14 | <i>O. oeni</i> | R1 | P8 | C24 |
| D22L9 | <i>O. oeni</i> | R1 | P3 | C26 |
| D22L7 | <i>O. oeni</i> | R2 | P1 | C27 |
| D13L8 | <i>O. oeni</i> | R3 | P2 | C28 |
| D13L2 | <i>O. oeni</i> | R4 | P1 | C29 |
| D12L10 | <i>O. oeni</i> | R5 | P7 | C30 |
| D23L15 | <i>O. oeni</i> | R5 | P1 | C11 |
| D10L4 | <i>Lc. mesenteroides</i> | R6 | P1 | C31 |
| D10L1 | <i>Lc. mesenteroides</i> | R6 | P8 | C31 |
| D12L3 | <i>O. oeni</i> | R7 | P3 | C18 |
| D21L7 | <i>O. oeni</i> | R7 | P2 | C10 |
| D11L2 | <i>O. oeni</i> | R7 | P1 | C17 |
| D13L9 | <i>O. oeni</i> | R7 | P4 | C10 |
| D23L13 | <i>O. oeni</i> | R8 | P3 | C11 |
| D23L10 | <i>O. oeni</i> | R8 | P1 | C14 |
| D23L2 | <i>O. oeni</i> | R8 | P8 | C12 |
| D21L4 | <i>O. oeni</i> | R8 | P2 | C11 |
| D21L9 | <i>O. oeni</i> | R8 | P9 | C8 |
| D12L5 | <i>O. oeni</i> | R8 | P5 | C10 |
| D12L6 | <i>O. oeni</i> | R8 | P4 | C17 |
| D10L5 | <i>O. oeni</i> | R8 | P3 | C11 |
| D12L4 | <i>O. oeni</i> | R9 | P1 | C19 |
| D12L8 | <i>O. oeni</i> | R9 | P4 | C15 |
| D23L9 | <i>O. oeni</i> | R10 | P5 | C1 |
| D23L11 | <i>O. oeni</i> | R11 | P1 | C1 |
| D11L7 | <i>O. oeni</i> | R12 | P3 | C3 |
| D13L14 | <i>O. oeni</i> | R13 | P1 | C2 |
| D11L3 | <i>O. oeni</i> | R14 | P8 | C16 |
| D13L10 | <i>O. oeni</i> | R14 | P1 | C10 |
| D23L6 | <i>O. oeni</i> | R14 | P10 | C9 |
| D13L17 | <i>O. oeni</i> | R14 | P2 | C6 |
| D10L3 | <i>O. oeni</i> | R15 | P1 | C16 |
| D20L4 | <i>O. oeni</i> | R16 | P2 | C12 |
| D20L3 | <i>O. oeni</i> | R16 | P9 | C8 |
| D22L3 | <i>O. oeni</i> | R16 | P2 | C14 |
| D11L8 | <i>O. oeni</i> | R16 | P3 | C12 |
| D12L9 | <i>O. oeni</i> | R16 | P2 | C12 |
| D13L12 | <i>O. oeni</i> | R16 | P8 | C8 |
| D13L15 | <i>O. oeni</i> | R16 | P2 | C12 |
| D13L11 | <i>O. oeni</i> | R16 | P4 | C14 |
| D13L5 | <i>O. oeni</i> | R16 | P9 | C4 |
| D13L1 | <i>O. oeni</i> | R16 | P2 | C26 |
| D13L7 | <i>O. oeni</i> | R16 | P5 | C4 |
| D12L12 | <i>O. oeni</i> | R16 | P1 | C5 |
| D13L3 | <i>O. oeni</i> | R16 | P8 | C14 |

Table 2 (continued)

| Isolate | Identification | RAPD-PCR | PFGE | Consensus |
|---------|----------------|----------|------|-----------|
| D12L11 | <i>O. oeni</i> | R16 | P9 | C8 |
| D21L8 | <i>O. oeni</i> | R17 | P1 | C13 |
| D20L1 | <i>O. oeni</i> | R18 | P1 | C7 |
| D10L2 | <i>O. oeni</i> | R19 | P3 | C23 |
| D22L2 | <i>O. oeni</i> | R19 | P8 | C20 |
| D11L1 | <i>O. oeni</i> | R19 | P4 | C24 |
| D22L5 | <i>O. oeni</i> | R19 | P5 | C24 |
| D12L1 | <i>O. oeni</i> | R19 | P2 | C24 |
| D13L13 | <i>O. oeni</i> | R19 | P6 | C22 |
| D23L8 | <i>O. oeni</i> | R19 | P8 | C21 |
| D23L1 | <i>O. oeni</i> | R19 | P1 | C25 |
| D10L6 | <i>O. oeni</i> | R19 | P9 | C23 |
| D20L2 | <i>O. oeni</i> | R20 | P1 | C20 |

According to the RAPD-PCR results, the genetic diversity of *O. oeni* species at the sampled cellar was relatively low compared with that reported by Zapparoli et al. (2000), who recorded 37 distinct macrorestriction patterns for 60 *O. oeni* isolates.

Regarding DD-PCR, it is important to highlight that the value of the similarity coefficient obtained in the reproducibility study ($r \geq 23\%$) was too low for this method to be suitable for typing. In contrast, Lechiancole et al. (2006), using the same primer as in the present study, reported that this method could be a good tool for discriminating *O. oeni* strains; however, they suggested that the method should be tested for reliability with different primers.

In our opinion, this method based on expressed RNA is highly sensitive to any environmental change, and even although identical conditions were applied during growth of isolates in the reproducibility study, the results were not as expected. This would explain why the technique has not been reported in other bacterial biodiversity studies.

The enhancement of discriminating capacity that was achieved when RAPD-PCR and PFGE patterns were subjected to combined numerical analysis corroborates reports by other authors (Ercolini et al., 2001; van Beek and Priest, 2002; Sánchez et al., 2004; Cocolin et al., 2004; Rodas et al., 2005; Valmorri et al., 2006; Aquilanti et al., 2006) as to the usefulness of this combined analysis for bacterial typing.

Like those of other authors (Kelly et al., 1993; Zapparoli et al., 2000), our results confirm that several *O. oeni* strains can grow simultaneously in a single spontaneous MLF. The genotyping data showed considerable microbial diversity in both vinifications, and therefore it would seem that fermentation is not led by a single genotype. The coincidence of seven major genotypes in both vinifications suggests that there is a microbiota well-adapted to the cellar conditions.

Numerous genotypes were detected only once during fermentation, and although these represent only a small proportion of the isolates, they were abundant enough to be isolated from countable plates.

In this study three different molecular typing techniques were used to assess the genetic diversity of the natural LAB ecosystem present in the MLF of Cencibel wines. The results indicate that both RAPD-PCR and PFGE are of value in typing this microbiota, although better discrimination was achieved with RAPD-PCR. DD-PCR has poor reproducibility which in our opinion renders it unsuitable.

The use of RAPD-PCR and PFGE and the combined numerical analysis of the results from both—a tool which to our knowledge has never been used before to study genetic diversity of lactic microbiota participating in MLF—has turned out to be a suitable procedure for discriminating the diversity of a complex ecosystem like that of MLF in wines.

Acknowledgements

The authors wish to thank Consejería de Educación y Ciencia of the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (JCCM) for the project PCC 05-003-2 and Ministerio de Educación y Ciencia (INIA) for the project RM 2006-00011-C02-02. P. Ruiz is supported by a grant of the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

References

- Aquilanti, L., Dell'Aquila, L., Zannini, E., Zochetti, A., Clementi, F., 2006. Resident lactic acid bacteria in raw milk Canestrato Pugliese cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 161–167.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Urso, R., Cantoni, C., Comi, G., 2004. Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1833–1894.
- Coucheney, F., Desroche, N., Bou, M., Tourdot-Maréchal, R., Dulau, L., Guzzo, J., 2005. A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 463–470.
- Davis, C.R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T.H., Fleet, G.H., 1985. Practical implications of malolactic fermentation: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 290–301.
- Dicks, L.M.T., Van Vuuren, H.J.J., Dellaglio, F., 1990. Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oenos*, as revealed by numerical analysis total soluble cell protein patterns, DNA base compositions, and DNA–DNA hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 83–91.
- Dykes, G.A., Von Holy, A., 1994. Strain typing in the genus *Lactobacillus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 63–66.
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S., 2001. The potential of a polyphasic PCR-dGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Syst. Appl. Microbiol.* 24 (4), 610–617.
- European Union, 1990. Reglamento por el que se determinan los métodos comunitarios aplicables al sector del vino. 2676/90, Bruselas.
- Farrow, J.A.E., Facklan, R.R., Collins, M.D., 1989. Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant leuconostocs and description of *Leuconostoc citreum* sp. nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 279–283.
- Gómez-Alegría, E., López, I., Ignacio Ruiz, J., Sáenz, J., Fernández, E., Zarazoga, M., Dizey, M., Torres, C., Ruiz-Larrea, F., 2004. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol. Lett.* 230, 53–61.
- Guerrini, S., Bastianini, A., Blaiotta, G., Granchi, L., Moschetti, G., Coppola, S., Romano, P., Vicenzini, M., 2003. Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical Italian wines. *Int. J. Food Microbiol.* 83, 1–14.
- Izquierdo, P.M., Tormo, J.A., Yébenes, A., 2000. Desarrollo de las fermentaciones malolácticas en vinos de Castilla-La Mancha. *Sem. Vitiv.* 2081, 1238–1241.
- Kelly, W.J., Huang, C.M., Asmundson, R.V., 1993. Comparison of *Leuconostoc oenos* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3969–3972.
- Kunkee, R.E., 1991. Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making. *FEMS Microbiol. Lett.* 88, 55–71.
- Lechiancole, T., Blaiotta, G., Messina, D., Fusco, V., Villani, F., Salzano, G., 2006. Evaluation of intra-specific diversities in *Oenococcus oeni* through analysis of genomic and expressed DNA. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 375–381.
- Le Jeune, C., Lonvaud-Funel, A., 1997. Sequence of DNA 16S/23S spacer region of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*): application to strain differentiation. *Res. Microbiol.* 148, 79–86.
- Lonvaud-Funel, A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Anton Leeuw Int. J.* 76, 317–331.
- Nigatu, A., 2000. Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lact. fermentum*, *Lact. rhamnosus*, *Lact. sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from kocho and tef. *J. Appl. Microbiol.* 89, 969–978.
- Pozo-Bayón, M.A., G-Alegria, E., Polo, M.C., Tenorio, C., Martín-Alvarez, P.J., Calvo de la Banda, M.T., Ruiz-Larrea, F., Moreno-Arribas, M.V., 2005. Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: effects of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8729–8735.
- Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75 (1), 149–164.
- Ribéreau-Gayón, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 1998a. *Traité d'Oenologie. 1 Microbiologie du vin*. Vinifications. Dunod, Paris.
- Rodas, A.M., Ferrer, S., Pardo, I., 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 412–422.
- Rodas, A.M., Ferrer, S., Pardo, I., 2005. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 197–207.
- Sánchez, I., Seseña, S., Palop, M.L., 2004. Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with “Almagro” eggplants spontaneous fermentation based on combined numerical analysis of randomly amplified polymorphic DNA and pulsed field gel electrophoresis patterns. *J. Appl. Microbiol.* 97, 446–458.
- Tenreiro, R., Santos, M.A., Pavesa, H., Vleira, G., 1994. Inter-strain relationship among wine leuconostocs and their divergence from other *Leuconostoc* species, as revealed by low frequency restriction fragment analysis of Genomic DNA. *J. Appl. Microbiol.* 77, 271–280.
- Valmorri, S., Settanni, L., Suzzi, G., Gardini, F., Vernocchi, P., Corsetti, A., 2006. Application of a novel polyphasic approach to study the lactobacilli composition of sourdoughs from the Abruzzo region (central Italy). *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 343–349.
- van Beek, S., Priest, F.G., 2002. Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 297–305.
- Vauterin, L., Vauterin, P., 1992. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *Eur. Microbiol.* 1, 37–41.
- Viti, C., Giovannetti, L., Granchi, L., Ventura, S., 1996. Species attribution and strain typing of *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) with restriction endonuclease fingerprints. *Res. Microbiol.* 147, 651–660.
- Zapparoli, G., Reguant, C., Bordons, A., Torriani, S., Dellaglio, F., 2000. Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Curr. Microbiol.* 40, 351–355.
- Zavaleta, A.I., Martínez-Murcia, A.J., Rodríguez-Valera, F., 1996. 16S-23S rDNA intergenic sequences indicate that *Leuconostoc oenos* is phylogenetically homogeneous. *Microbiology* 142, 2105–2114.
- Zavaleta, A.I., Martínez-Murcia, A.J., Rodríguez-Valera, F., 1997. Intraspecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting and sequence analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1261–1267.



**Ecological study of lactic acid microbiota isolated from
Tempranillo wines of Castilla-La Mancha**

Izquierdo, P.M., **Ruiz, P.**, Seseña, S. y Palop, M.LI.

J. Biosci. Bioeng. 108, 220-224

Ecological study of lactic acid microbiota isolated from Tempranillo wines of Castilla-La Mancha

Pedro Miguel Izquierdo Cañas,¹ Patricia Ruiz Pérez,²
Susana Seseña Prieto,² and Maria Llanos Palop Herreros^{2,*}

Instituto de la Vid y del Vino de Castilla-La Mancha, Crta. Toledo-Albacete s/n, 13700, Tomelloso (Ciudad Real), Spain¹ and Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Universidad de Castilla-La Mancha, Avda. Carlos III s/n, 45071, Toledo, Spain²

Received 20 January 2009; accepted 1 April 2009

The genetic diversity of 339 strains of lactic acid bacteria responsible for the spontaneous malolactic fermentation (MLF) in Tempranillo wines produced in six cellars located in different provinces of Castilla-La Mancha region of Spain was analyzed by using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). The results indicate that *Oenococcus oeni* was the predominant species in MLF of Tempranillo wines with a scant diversity of other lactic acid bacteria (LAB) species. The presence of a well-adapted cellar microbiota is confirmed, with MLF dominated by a limited number of *O. oeni* genotypes. Clustering of isolates from samples taken from different provinces showed the existence of coincident genotypes in different cellars of the region. This result suggests that a population of cosmopolitan *O. oeni* strains exists in the Castilla-La Mancha wine-growing region.

© 2009, The Society for Biotechnology, Japan. All rights reserved.

[Key words: Malolactic fermentation; *Oenococcus oeni*; Lactic acid bacteria; Wine; Genetic characterisation; RAPD-PCR]

Winemaking is a complex process frequently involving two successive fermentations; first an alcoholic fermentation carried out by yeasts, and later a malolactic fermentation (MLF) conducted by lactic acid bacteria. *Oenococcus oeni* has been described as the species best adapted to overcome wine conditions (alcohol content, SO₂ concentration and pH). During MLF, L-malic acid is converted to L-lactic acid and carbon dioxide, which reduces total acidity and improves the biological stability of wine. In addition, multiple transformations occur which improve the organoleptic properties of wine (1).

Malolactic fermentation is usually performed by the autochthonous lactic acid bacteria existing in grapes and cellars, but sometimes the process may occur over weeks without always achieving satisfactory results (2). In recent years, the use of commercial freeze-dried bacterial cultures of *O. oeni* for direct inoculation into wine has improved the control of MLF, assuring the completion of this process and avoiding formation of undesirable secondary products (3). However, induction of MLF by inoculation with commercially available strains of *O. oeni* is not always successful. The difficulty in inducing MLF in wine remains problematic because wine is a very harsh environment for bacterial growth (4). Thus, the use of an autochthonous starter culture well-adapted to the conditions of this specific wine-producing area would be advisable (3).

Designing of a starter culture first requires an ecological study of the microbiota present during the spontaneous process, with a view

to ascertaining the dominance of strains well-adapted to the specific production technology (5). Thereafter, an intra-specific characterisation will be needed. Biochemical characterisation, although useful for identification purposes, has poor discriminating capability, and molecular techniques must be used when a high level of discrimination is required. Of the various typing methods available for this purpose, those based on polymerase chain reaction (PCR) product analysis, such as Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) are reported to be simple and rapid to perform, providing a good level of discrimination (6). This method can also be used on purified DNA (7) and on treated (8) or lysed cells without previous DNA extraction (9); it is therefore considered the most suitable method when a large number of strains are analyzed (10). Some authors (11) have reported successful use of RAPD-PCR for typing *O. oeni*, even when isolates from the same region were analyzed.

In a previous study about the MLF that takes place in Tempranillo wines elaborated in Castilla-La Mancha (12), only a limited number of cellars from a single province of this region were sampled. This paper reports typing of spontaneous lactic acid microbiota isolated from wine samples taken during MLF from six cellars located in different provinces of Castilla-La Mancha (Spain) by using RAPD-PCR. Analysis cluster of RAPD-PCR patterns was conducted to determine the existence of different genotypes and to study the growth dynamic of the predominant genotypes. This study will contribute to a better knowledge and to the preservation of the indigenous microbial population responsible for the typical features of Tempranillo wines elaborated in this area.

* Corresponding author. Tel.: +34 925 265 716; fax: +34 925 268 840.
E-mail address: MariaLlanos.Palop@uclm.es (M.L.P. Herreros).

MATERIALS AND METHODS

Vinification and samples collection Samples of Tempranillo wine were aseptically collected during the 2005 vintage from six cellars (A–F) located in 4 provinces of the Castilla-La Mancha region (Spain). At each cellar two batches (I and II) were sampled. Samples were taken aseptically when alcoholic fermentation was complete (stage 0), at the middle and at the end of MLF (stages 1 and 2), respectively.

Chemical analysis Samples taken at stages 0 and 2 were analyzed for the most common chemical parameters in the wine, namely L-malic acid, L-lactic acid, citric acid, total acidity, pH, free SO₂ content and volatile acidity in accordance with the procedures described in the Official Methods of Wine Analysis (13). Alcohol content was determined only in stage 0 samples.

Microbiological analysis and LAB isolation Serial dilutions in sterile saline solution were spread onto MLOA Agar (MLOA, *Oenococcus oeni* Medium) (Scharlab, Barcelona, Spain) supplemented with 10% (v/v) tomato juice, 50 mg/ml sodium azide and 100 mg/ml cycloheximide. Plates were incubated under anaerobic (Gas Pack System, Oxoid, Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) conditions at 30 °C for 5 days. Counts were expressed as colony forming units (cfu) per ml of wine. A number of colonies (14) were randomly picked and purified by sub-culturing onto the same medium. Pure cultures were stored frozen at –80 °C.

The reference strains *Oenococcus oeni* 218, *O. oeni* 4742 and *O. oeni* 4759, from the Spanish Type Culture Collection (CECT), were used in this study.

Strain typing of LAB isolates by RAPD-PCR Genomic DNA was obtained following the procedure described by Rodas et al. (15). RAPD-PCR and a reproducibility study were carried out as described by Ruiz et al. (16).

Genotypic and phenotypic identification of LAB isolates Identification to species level by Amplification and Restriction Analysis of 16S-rRNA gene (16S-ARDRA) (15) was carried out for a representative number of isolates which were selected on the basis of subsequent RAPD-PCR results.

Isolates showing 16S-ARDRA patterns different to that corresponding to *O. oeni* were further characterized using API 50CH galleries (API system, BioMerieux, Marcy l'Etoile, France).

RESULTS

Chemical analysis Table S1 shows the mean value and the standard deviation obtained for the chemical parameters analyzed at samples taken before and after MLF. The trend observed for all of them was the habitual for this process.

Microbial counts LAB counts on MLOA plates (Table 1) at the end of alcoholic fermentation (stage 0) were between 10² and 10⁶ cfu/ml, increasing to 10⁵–10⁷ cfu/ml during MLF. Important differences in MLF duration were observed, both between cellars and batches, ranging between 7 and 37 days, with a mean value of 16 days. BII wine, which had the highest alcohol content (14.5%) and the lowest LAB counts (1.6 × 10² cfu/ml), presented the longest MLF, in spite of which volatile acidity only increased 0.04 g/l during this process. MLF was shorter in wines from cellar C; nevertheless, the fact that stage 0 samples presented high LAB counts, lower malic acid contents and higher lactic acid contents would suggest that MLF had already started when samples were taken. The evolution of LAB counts was similar for all the cellars; the highest increases occurred between stages 0 and 1, which correlates with the highest malic acid degradation (data not shown).

TABLE 1. LAB counts (cfu/ml) and isolates obtained during MLF.

| Cellar | Batch | MLF duration (days) | Stage | | | No. of isolates |
|--------|-------|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------|
| | | | 0 | 1 | 2 | |
| A | I | 14 | 1.87 × 10 ⁴ | 3.70 × 10 ⁶ | 1.61 × 10 ⁷ | 38 |
| | II | 7 | 9.80 × 10 ⁵ | 6.60 × 10 ⁶ | 3.12 × 10 ⁷ | 34 |
| B | I | 15 | 2.20 × 10 ⁴ | 2.90 × 10 ⁶ | 1.96 × 10 ⁷ | 39 |
| | II | 37 | 1.60 × 10 ² | 2.45 × 10 ⁵ | 1.80 × 10 ⁷ | 31 |
| C | I | 11 | 2.07 × 10 ⁶ | 9.00 × 10 ⁶ | 1.42 × 10 ⁷ | 20 |
| | II | 8 | 1.36 × 10 ⁵ | 1.65 × 10 ⁷ | 2.36 × 10 ⁶ | 24 |
| D | I | 20 | 6.10 × 10 ² | 4.45 × 10 ⁵ | 4.28 × 10 ⁶ | 20 |
| | II | 19 | 4.02 × 10 ⁵ | 1.69 × 10 ⁶ | 2.00 × 10 ⁷ | 32 |
| E | I | 17 | 8.50 × 10 ² | 3.60 × 10 ⁵ | 4.32 × 10 ⁵ | 15 |
| | II | 17 | 6.26 × 10 ³ | 5.15 × 10 ⁶ | 1.52 × 10 ⁵ | 26 |
| F | I | 15 | 8.38 × 10 ⁴ | 1.10 × 10 ⁶ | 1.71 × 10 ⁶ | 29 |
| | II | 12 | 3.30 × 10 ⁶ | 2.47 × 10 ⁷ | 1.69 × 10 ⁶ | 31 |

Values are the means of duplicates.

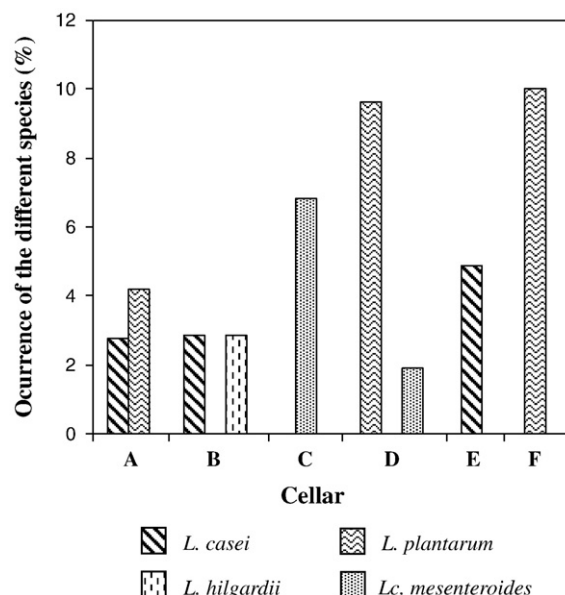


FIG. 1. Percentage of species non-Oenococcus present during MLF at each cellar.

RAPD-PCR analysis and identification of isolates A total of 339 LAB isolates were obtained from MLOA plates (Table 1). RAPD-PCR using M13 primer enabled isolates from each cellar to be grouped into clusters (data not shown) defined at a minimum similarity level of 83%, the value obtained in the reproducibility study. The number of genotypes present in each cellar varied between 28 for cellar A and 6 for cellar E.

Identification by 16S-ARDRA of representative isolates from clusters obtained in the dendrograms from each cellar showed that 92.3% of the isolates belonged to the *Oenococcus oeni* species.

Twenty-six non-*Oenococcus* isolates had been isolated from all the cellars and from samples taken at all stages, although they were more abundant at the beginning of MLF (stages 0 and 1). Biochemical characterisation using API 50CH galleries assigned 6 of them to the species *Lactobacillus* (*L.*) *casei*, 14 to *L. plantarum*, 2 to *L. hilgardii* and 4 to *Leuconostoc* (*Lc.*) *mesenteroides*. Fig. 1 shows the percentage of species non-*Oenococcus* present at each cellar.

When RAPD-PCR patterns of 313 *O. oeni* isolates were compared using the GelCompar analysis software package, 63 genotypes were obtained (Fig. 2). Thirty-three major genotypes clustered 3 or more isolates and the remaining displayed singular RAPD-PCR patterns. Eleven genotypes comprised isolates from two or more cellars, with genotype 31 comprising the highest number of isolates from all the cellars. Interestingly isolates from each cellar included in genotype 31 also grouped at major genotypes when isolates from each cellar were analyzed.

The reference strains displayed singular patterns and none of the 313 *O. oeni* isolates analyzed clustered with them.

It is important to highlight that some isolates from different cellars grouped at a same genotype, presented a high percentage of similarity; i.e. isolates from cellars B and C grouped at genotype 50 and some from cellars B, E, and F grouped at genotype 31 displayed 98.3% and 95.8% similarity, respectively (data not shown).

RAPD-PCR analysis of the non-*Oenococcus* isolates discriminated 11 different genotypes. Fourteen *L. plantarum* isolates clustered at 5 genotypes, 6 *L. casei* isolates clustered at 3 genotypes, both *L. hilgardii* isolates clustered at the same genotype and 4 *Lc. mesenteroides* isolates clustered at 2 genotypes (data not shown).

Fig. 3 shows the frequency of isolation (%) of the 33 major genotypes of *O. oeni* for each stage of MLF, for both batches at all the cellars. Malolactic fermentations were dominated by a limited

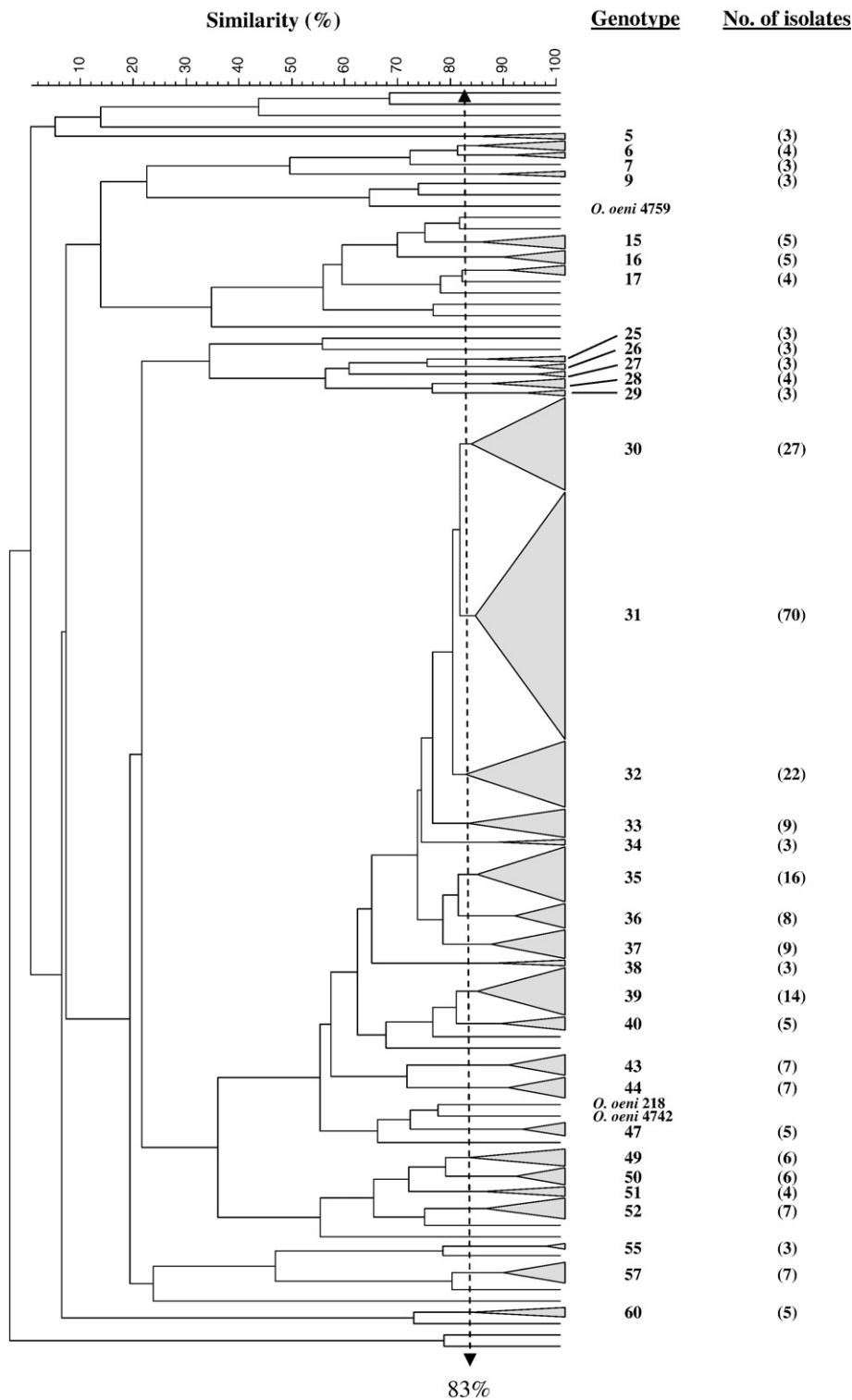


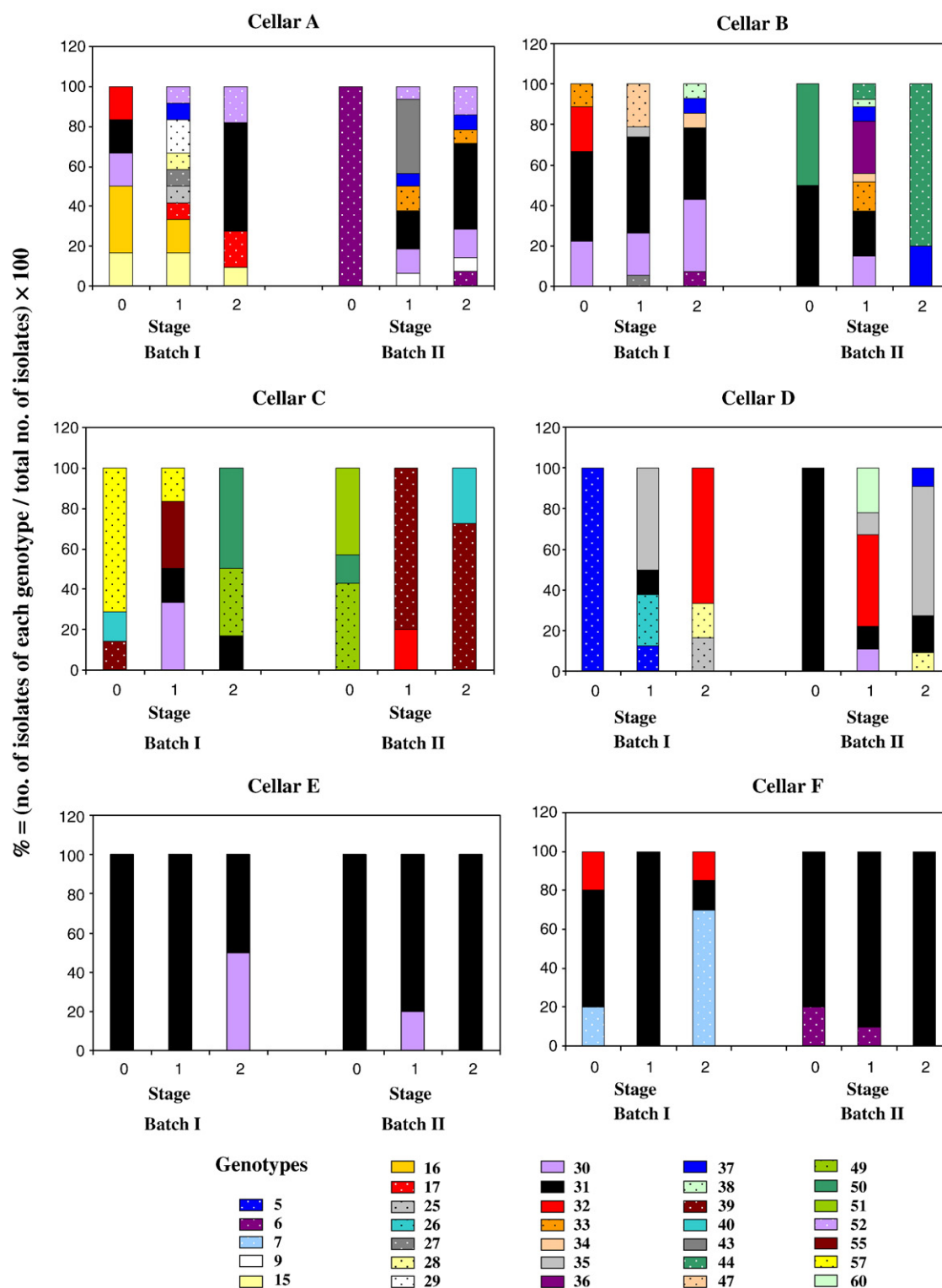
FIG. 2. Abridged dendrogram obtained from UPGMA analysis of M13 RAPD-PCR patterns. The scale indicates the similarity level (Pearson coefficient level $r \times 100$).

number of genotypes despite the detection of considerable diversity at particular stages in some cellars. The presence, albeit intermittent, of coincident genotypes in both batches at each cellar was also observed.

Genotype 31 was one of the predominant genotypes at wineries A, B, E and F, where it was present at all the stages of both batches, with the exception of stage 1 in batch I and stage 0 in batch II of cellar A and stage 2 in the batch II of cellar B.

DISCUSSION

Results of chemical parameters from this study were similar to those reported for Tempranillo wines by Izquierdo et al. (17). Major differences in MLF duration were observed between cellars what, as reported by some authors (18), could be attributable to a different LAB growth influenced by factors such as pH, sulphur dioxide (SO₂), temperature, nutrient availability and alcohol content. Although a

FIG. 3. Frequency of isolation (%) of the 33 major genotypes of *O. oeni*.

correlation between free SO_2 content and LAB counts was not observed, the lowest LAB counts and the longest MLF duration of BII batch could be attributable to the higher alcohol content.

In concordance with the results obtained by other authors (18), *O. oeni* was the predominant species in MLF of Tempranillo wines. However, it was not the only species responsible for the occurrence of spontaneous MLF in these wines; in fact several *Lactobacillus* spp. and

Leuconostoc mesenteroides were also identified. The presence of *Lactobacillus brevis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. hilgardii* and *Lc. mesenteroides* has been reported in MLF (18), though their viability decreases significantly during alcoholic and malolactic fermentations due to the chemical changes that take place.

RAPD-PCR represented a useful tool to discriminate the diversity of *O. oeni* isolates from the same region (11), and a high polymor-

phism was observed both for the reference strains and for *O. oeni* isolates (19).

The presence of coincident genotypes in different batches from each cellar and clustering in the same genotype of isolates from samples originating from different provinces reveals that there is an endemic microbiota well-adapted not only to the conditions of elaboration used in the cellar but also to the ecological conditions of this specific wine-producing area (20). It would seem to exist a geographic distribution in *O. oeni* strains that grow spontaneously in wine. Forthcoming vintages should be analyzed to know if it still persists.

The persistent presence in all the cellars analyzed of these *O. oeni* strains suggests a potential industrial utility if technological characterisation should confirm that they possess desirable sensory and fermentation properties in further researches.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Consejería de Educación y Ciencia of the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (JCCM) and the Ministerio de Educación y Ciencia (INIA) for financial support (projects PCC 05-003-2 and RM 2006-00011-C02-02). P. Ruiz is supported by a grant from the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jbiosc.2009.04.001.

References

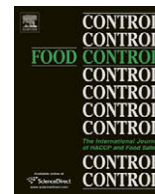
- Kunkee, R. E.: Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making, *FEMS Microbiol. Lett.*, **88**, 55–71 (1991).
- Agouridis, N., Bekatorou, A., Nigam, P., and Kanellaki, M.: Malolactic fermentation in wine with *Lactobacillus casei* cells immobilized on delignified cellulosic material, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2546–2551 (2005).
- Nielsen, J. C., Prah, C., and Lonvaud-Funel, A.: Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-dried *Leuconostoc oenos* cultures, *Am. J. Enol. Vitic.*, **47**, 42–48 (1996).
- Coucheney, F., Desroche, N., Bou, M., Tourdot-Maréchal, R., Dulau, L., and Guzzo, J.: A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters, *Int. J. Food Microbiol.*, **105**, 463–470 (2005).
- Vogel, R. F., Ehrmann, M. A., and Gänzle, M. G.: Development and potential of starter lactobacilli resulting from exploration of the sourdough ecosystem, *Anton. Leeuw. Int. J.G.*, **81**, 631–638 (2002).
- Seseña, S., Sánchez, I., and Palop, M. LL.: Characterization of *Lactobacillus* strains and monitoring by RAPD-PCR in controlled fermentations of “Almagro” eggplants, *Int. J. Food Microbiol.*, **104**, 325–335 (2005).
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livek, K. T., Rafalski, J. A., and Tingy, S. V.: DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6531–6535 (1990).
- Mazurier, S., Van de Giessen, A., Heuvelman, K., and Wernars, K.: RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA, *Lett. Appl. Microbiol.*, **14**, 260–262 (1992).
- Moschetti, G., Blaiotta, G., and Aponte, M.: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains, *J. Appl. Microbiol.*, **85**, 25–36 (1998).
- Sánchez, I., Seseña, S., and Palop, M. LL.: Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with “Almagro” eggplants spontaneous fermentation based on combined numerical analysis of randomly amplified polymorphic DNA and pulsed field gel electrophoresis patterns, *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 446–458 (2004).
- Bartowsky, E., McCarthy, J., and Henschke, P. A.: Differentiation of Australian wine isolates of *Oenococcus oeni* using random amplified polymorphic DNA (RAPD), *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **9**, 122–126 (2003).
- Izquierdo, P. M., García, E., Martínez, J., and Chacón, J. L.: Selection of lactic acid bacteria to induce malolactic fermentation in red wine of cv, Cencibel. *Vitis*, **43**, 149–153 (2004).
- European Union: Commission Regulation Determining Community Methods for the Analysis of Wines, 2676/90, European Union, Brussels, 1990.
- Harrigan, W. F. and McCance, M. E.: Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology, Academic Press, New York, 1976.
- Rodas, A. M., Ferrer, S., and Pardo, I.: 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine, *Syst. Appl. Microbiol.*, **26**, 412–422 (2003).
- Ruiz, P., Izquierdo, P. M., Seseña, S., and Palop, M. LL.: Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns, *Food Microbiol.*, **25**, 942–948 (2008).
- Izquierdo, P. M., Seseña, S., Ruiz, P., and Palop, M. LL.: Producción de acidez volátil y degradación de ácido cítrico por cepas de *Oenococcus oeni* aisladas de la fermentación maloláctica espontánea de vinos Cencibel elaborados en Castilla-La Mancha, *Vitic. Enol. Profesional*, **111**, 37–42 (2007).
- du Plessis, H. W., Dicks, L. M. T., Pretorius, S., Lambrechts, M. G., and du Toit, M.: Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines, *Int. J. Food Microbiol.*, **91**, 19–29 (2004).
- Zapparoli, G., Reguant, C., Bordons, A., Torriani, S., and Dellaglio, F.: Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR, *Curr. Microbiol.*, **40**, 351–355 (2000).
- Guerrini, S., Bastianini, A., Blaiotta, G., Granchi, L., Moschetti, G., Coppola, S., Romano, P., and Vicenzini, M.: Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical Italian wines, *Int. J. Food Microbiol.*, **83**, 1–14 (2003).



Analysis of lactic acid bacteria populations during spontaneous malolactic fermentation of Tempranillo wines at five wineries during two consecutive vintages

Ruiz, P., Izquierdo, P.M., Seseña, S. y Palop, M.LI.

Food Control 21, 70-75



Analysis of lactic acid bacteria populations during spontaneous malolactic fermentation of Tempranillo wines at five wineries during two consecutive vintages

P. Ruiz^a, P.M. Izquierdo^b, S. Seseña^a, M.Ll. Palop^{a,*}

^a Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Universidad de Castilla-La Mancha, Avda. Carlos III s/n, 45071 Toledo, Spain

^b Instituto de la Vid y del Vino de Castilla-La Mancha, Crta. Toledo-Albacete s/n, 13700 Tomelloso (Ciudad Real), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 February 2009

Received in revised form 27 March 2009

Accepted 3 April 2009

Keywords:

Lactic acid bacteria
Malolactic fermentation
Tempranillo wine
Oenococcus oeni
RAPD-PCR

ABSTRACT

The ecology and the population dynamics of lactic acid bacteria during malolactic fermentation of Tempranillo wine made at five wineries in Castilla-La Mancha were analysed for two consecutive vintages (years 2006 and 2007). This microbiota was typed using Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) subsequently identified using both molecular and phenotypic methods. *Oenococcus oeni* was the predominant species. Genotypes varied considerably in both of the vintages from each winery, although a number of coincident genotypes were found in each one. Three genotypes were present in all the wineries in at least one of the vintages. These results confirm the existence of a coincident population of *O. oeni* genotypes that may be considered endemic to this wine region and that seem to play an important role in all the vinifications.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Malolactic fermentation (MLF) is a process in which L-malate is converted to L-lactate and carbon dioxide. It is usually performed by the autochthonous lactic acid microbiota (LAB) existing in grapes and wineries, although sometimes induction of MLF by inoculation with commercially available strains of *Oenococcus oeni* is used. However, it is not always successful and the process may occur over weeks without always achieving satisfactory results (Maicas, 2001; Agouridis, Bekatorou, Nigam, & Kanellaki, 2005).

Previous reports have shown the presence of different species and strains of LAB in spontaneous MLF, although *O. oeni* has been described as the predominant species in all cases (Guerrini et al., 2003; Larisiki, Claus, & Köning, 2008; Rodas, Ferrer, & Pardo, 2003). This diversity can be influenced by diverse factors such as the geographical location (Guerrini et al., 2003) or the technology used in vinification (Andorrá, Landi, Mas, Guillamón, & Esteve-Zarzoso, 2008; Reguant, Carreté, Constantí, & Bordons, 2005). Some studies dealing with yeast populations (Gutierrez, Santamaría, Epifanio, Garijo, & López, 1999; Izquierdo, Ubeda, & Briones, 1997; Santamaría, Garijo, López, Tenorio, & Gutiérrez, 2005) have shown that the succession order of species and the diversity of strains can differ from year to year in the same winery, thus accounting for the differences in wine characteristics.

In recent years, much work has been done on the ecology of MLF, but less is known about year-to-year variability of LAB strains in the wineries (Reguant et al., 2005).

Recent studies at our laboratory (Izquierdo, Ruiz, Seseña, & Palop, 2009) have shown the presence of a broad-based population of *O. oeni* strains in Tempranillo wines made at six wineries in Castilla-La Mancha. The objective of this new study is therefore to expand our knowledge of this issue by studying five different wineries during two consecutive vintages. In that way we can compare both the microbiota composition and the year-to-year variability. These studies are particularly useful in order to establish the existence of strains specific to oenological areas and also to select the most representative ones for use as starter cultures in vinifications carried out in that specific oenological area.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

Samples of Tempranillo wine were taken during the 2006 and 2007 vintages at five wineries (A–E) located in three provinces of the Castilla-La Mancha region (Spain). The wineries were selected because they had never used commercial starters for MLF. The winemaking process involves manual harvesting of grapes followed by vinification practices typical of that specific wine-producing area. Briefly, this consists of a controlled alcoholic fermentation at 25 ± 2 °C in stainless steel or jar tanks followed

* Corresponding author. Tel.: +34 925 265 716; fax: +34 925 268 840.

E-mail address: MariaLlanos.Palop@uclm.es (M.Ll. Palop).

by spontaneous MLF. Active dry yeasts were used to induce alcoholic fermentation.

Two batches (I and II) were sampled at each winery. Samples were aseptically collected at the end of alcoholic fermentation (stage 0) and at the middle and the end of MLF (stages 1 and 2, respectively). The criterion for defining the middle and the end of MLF was the content of the L-malic acid in the wines determined using an enzymatic test (Boehringer Mannheim; Mannheim, Germany). Samples were kept in a commercial refrigerator (~8 °C) until analysis.

Data for the most common chemical parameters (pH, alcohol content, L-malic acid, L-lactic acid, citric acid, total acidity, free SO₂ content and volatile acidity) were obtained from the wineries and were within the usual range for this process. During MLF a decrease in total acidity of around 1 g L⁻¹ and a subsequent increase in pH of approximately 0.2 units were observed. In addition an increase of 0.13 g L⁻¹ in volatile acidity and the almost total transformation of malic acid into lactic acid, and decrease of citric acid were noted. Alcohol content ranged between 13.00% and 14.50% and free SO₂ content was between 9.00 and 16.00 mg L⁻¹.

2.2. Microbiological analysis and LAB isolation

Wine samples were diluted in sterile saline solution and plated onto MLO Agar (Medium for *Leuconostoc oeni*) (Scharlab, Barcelona, Spain) supplemented with 10% (v/v) tomato juice. 50 mg L⁻¹ sodium azide and 100 mg L⁻¹ cycloheximide were also added to the medium to suppress acetic acid bacteria and yeast growth. Plates were incubated anaerobically (Gas Pack System, Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK) at 30 °C for five days, after which those containing between 30 and 300 colonies were counted. Counts were expressed as colony forming units (cfu) per mL of wine.

Colonies were picked at random in a number equal to the square root of the total number of colonies present on counted plates (Harrigan & McCance, 1976), seeking to ensure that all different colony morphologies were recovered in each case. Isolates were sub-cultured onto the same medium until purification. Pure cultures in MLO broth were stored at -80 °C with 20% (v/v) glycerol (Panreac, Barcelona, Spain).

The reference strains used in this study were *O. oeni* 217 and *O. oeni* 4028 from the Spanish Type Culture Collection (CECT).

2.3. Strain typing of LAB isolates by RAPD-PCR

Genomic DNA was obtained from well-developed single colonies on MLOA following the procedure described by Rodas et al. (2003). A colony was suspended in 10 µL sterile milli-Q water and 1 µL of the suspension used for PCR reactions.

Isolates from both vintages were analysed by RAPD-PCR as described by Ruiz, Izquierdo, Seseña, and Palop (2008). M-13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') primer purchased from Bonsai Technologies Group (Madrid, Spain) was used. Reactions were performed in a total volume of 20 µL in a GeneAmp 2400 Thermal Cycler (GeneAmp, PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Amplification products were resolved by electrophoresis at a constant voltage of 50 V in 1.5% (w/v) agarose in 1 × TBE buffer (45 mM Tris-base, 89 mM boric acid, 2.5 mM EDTA; pH 8.3) gels containing 0.5 µg mL⁻¹ of ethidium bromide. A 100 bp ladder (Bio-tools, Madrid, Spain) was used as a DNA molecular weight marker and as a normalization reference. RAPD-PCR gels were photographed with a KODAK DC290 Zoom Digital Camera (Eastman Kodak Company, USA). The patterns were normalized and further processed with the GelCompar version 4.0 analysis software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) (Vauterin & Vauterin, 1992). Strains were grouped using the Pearson product-moment correlation coefficient (*r*) and cluster analysis by UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average).

To determine the minimum percent similarity necessary for strain discrimination, a reproducibility study, as described by Ruiz et al. (2008), was carried out on six isolates and four iterations of the entire procedure described above.

2.4. Identification of LAB isolates

2.4.1. Amplification and restriction analysis of 16S-rRNA gene (16S-ARDRA)

Representative isolates from clusters obtained in the numerical analysis of RAPD-PCR patterns from each winery and the reference strains were analysed by 16S-ARDRA as described by Rodas et al.

Table 1
LAB counts (cfu mL⁻¹) and isolates obtained during MLF.

| Winery | Vintage | Batch | MLF duration (days) | Stage | | | No. of isolates | No. of genotypes |
|--------|---------|-------|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------|------------------|
| | | | | 0 | 1 | 2 | | |
| A | 2006 | I | 14 | 1.87 × 10 ⁴ | 3.70 × 10 ⁶ | 1.61 × 10 ⁷ | 38 | 28 |
| | | II | 7 | 9.80 × 10 ⁵ | 6.60 × 10 ⁶ | 3.12 × 10 ⁷ | 34 | |
| | 2007 | I | 14 | 7.90 × 10 ² | 7.50 × 10 ⁶ | 1.56 × 10 ⁷ | 36 | 29 |
| | | II | 12 | 9.70 × 10 ² | 1.71 × 10 ⁶ | 2.60 × 10 ⁷ | 36 | |
| B | 2006 | I | 15 | 2.20 × 10 ⁴ | 2.90 × 10 ⁶ | 1.96 × 10 ⁷ | 39 | 25 |
| | | II | 37 | 1.60 × 10 ² | 2.45 × 10 ⁵ | 1.80 × 10 ⁷ | 31 | |
| | 2007 | I | 10 | 4.10 × 10 ³ | 2.77 × 10 ⁶ | 4.80 × 10 ⁷ | 36 | 6 |
| | | II | 8 | 1.58 × 10 ⁴ | 1.25 × 10 ⁷ | 1.49 × 10 ⁷ | 35 | |
| C | 2006 | I | 28 | 3.60 × 10 ³ | 1.45 × 10 ⁷ | 2.82 × 10 ⁷ | 31 | 20 |
| | | II | 32 | 1.50 × 10 ² | 8.30 × 10 ⁶ | 2.18 × 10 ⁷ | 28 | |
| | 2007 | I | 15 | 1.00 × 10 ⁴ | 3.90 × 10 ⁶ | 1.55 × 10 ⁷ | 36 | 43 |
| | | II | 11 | 2.97 × 10 ⁶ | 6.30 × 10 ⁶ | 1.68 × 10 ⁷ | 36 | |
| D | 2006 | I | 11 | 2.07 × 10 ⁶ | 9.00 × 10 ⁶ | 1.42 × 10 ⁷ | 20 | 10 |
| | | II | 8 | 1.36 × 10 ⁵ | 1.65 × 10 ⁷ | 2.36 × 10 ⁶ | 24 | |
| | 2007 | I | 24 | 3.80 × 10 ³ | 2.17 × 10 ⁵ | 6.38 × 10 ⁷ | 34 | 16 |
| | | II | 21 | 1.30 × 10 ³ | 1.70 × 10 ⁶ | 4.96 × 10 ⁶ | 36 | |
| E | 2006 | I | 20 | 6.10 × 10 ² | 4.45 × 10 ⁵ | 4.28 × 10 ⁶ | 20 | 12 |
| | | II | 19 | 4.02 × 10 ⁵ | 1.69 × 10 ⁶ | 2.00 × 10 ⁷ | 32 | |
| | 2007 | I | 10 | 9.96 × 10 ³ | 5.45 × 10 ⁶ | 2.66 × 10 ⁷ | 36 | 13 |
| | | II | 24 | 2.75 × 10 ³ | 8.20 × 10 ⁶ | 6.05 × 10 ⁶ | 34 | |

Data are the mean values.

(2003). Restriction of the amplified fragment was carried out overnight at 37 °C in 20 µL of incubation buffer containing 5 U of the restriction enzyme *MseI* (New England BioLabs, Ipswich, UK) and enough PCR product to give 500 ng DNA (2–10 µL). Restriction fragments patterns were analysed by electrophoresis at a constant voltage of 90 V in 2% (w/v) agarose in 1 × TBE gels using a 100 bp ladder (Biotools, Madrid, Spain) as a molecular size marker.

2.4.2. Phenotypic identification

Isolates showing 16S-ARDRA patterns different from that of *O. oeni* were further characterized using API 50CH galleries (API system, BioMerioux, Marcy l'Etoile, France). Interpretation of the carbohydrate fermentation profiles and species assignment were performed using the Apilab Plus computer-assisted identification programme (version 4.0 BioMerioux).

Table 2

O. oeni genotypes participating at each winery and vintage and the frequency (%) of their appearance.

| Genotypes | Winery A | | Winery B | | Winery C | | Winery D | | Winery E | |
|------------------------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|
| | 2006 | 2007 | 2006 | 2007 | 2006 | 2007 | 2006 | 2007 | 2006 | 2007 |
| I | – | 5 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| II | – | 7 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| III | – | 5 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| IV | 3 | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| V | 3 | 5 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| VI | 2 | – | 1 | – | – | – | – | – | – | – |
| VII | – | 22 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| VIII | – | 2 | – | – | – | – | – | 5 | – | – |
| IX | – | 9 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| X | – | 4 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| XI | – | – | – | – | – | – | – | 14 | – | – |
| XII | 9 | – | – | – | 7 | 2 | – | – | – | – |
| XIII | – | – | – | – | – | – | 15 | – | – | – |
| XIV | – | – | 1 | – | 2 | – | 7 | 10 | – | 1 |
| XV | – | – | – | – | – | – | 7 | – | – | – |
| XVI | – | – | 8 | – | – | – | – | – | – | – |
| XVII | 23 | 27 | 27 | 38 | – | 2 | 7 | – | 18 | 63 |
| XVIII | 2 | – | 8 | 1 | 2 | – | 2 | – | 44 | 6 |
| XIX | – | – | 18 | 12 | – | 2 | 2 | 5 | 2 | 3 |
| XX | 6 | 4 | 5 | 44 | – | – | – | – | – | 3 |
| XXI | – | – | – | – | 16 | – | 2 | – | – | 1 |
| XXII | – | – | – | – | – | – | 10 | – | – | – |
| XXIII | 14 | – | 10 | – | 2 | – | – | 5 | 6 | 21 |
| XXIV | 6 | – | 4 | – | – | – | – | – | 2 | – |
| XXV | – | – | 3 | – | – | – | – | – | – | – |
| XXVI | – | – | – | – | – | – | – | 36 | – | – |
| XXVII | – | – | – | – | – | – | – | 10 | – | – |
| XXVIII | – | – | – | 2 | – | – | – | – | – | – |
| XXIX | 3 | – | 4 | 1 | – | – | – | 5 | 16 | 1 |
| XXX | – | – | 3 | – | – | – | – | – | – | – |
| XXXI | – | 2 | 1 | – | – | – | – | – | – | – |
| XXXII | – | – | 1 | – | – | 2 | – | – | – | – |
| XXXIII | – | – | – | – | – | 4 | – | – | – | – |
| XXXIV | – | – | 5 | 1 | – | 2 | – | – | – | – |
| XXXV | – | – | – | – | – | 4 | – | – | – | – |
| XXXVI | – | – | – | – | – | – | 15 | – | – | – |
| XXXVII | – | – | – | – | – | – | 33 | – | – | – |
| XXXVIII | – | – | – | 1 | – | 12 | – | – | – | – |
| XXXIX | – | – | – | – | – | 4 | – | – | – | – |
| XL | – | – | – | – | – | – | – | 10 | – | – |
| XLI | – | – | – | – | – | 2 | – | – | – | 1 |
| XLII | – | – | – | – | – | 3 | – | – | – | – |
| XLIII | – | – | – | – | – | 3 | – | – | – | – |
| XLIV | – | 4 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| XLV | – | – | – | – | – | 3 | – | – | – | – |
| XLVI | 2 | – | – | – | 23 | 3 | – | – | – | – |
| XLVII | – | – | – | – | 7 | – | – | – | – | – |
| XLVIII | – | – | – | – | 9 | 4 | – | – | – | – |
| XLIX | 2 | – | 1 | – | – | – | – | – | – | – |
| L | – | – | – | – | – | 3 | – | – | – | – |
| Li | – | – | – | – | 9 | 17 | – | – | 4 | – |
| LII | – | – | – | – | – | 3 | – | – | – | – |
| LIII | 2 | – | – | – | 18 | 17 | – | – | 4 | – |
| LIV | 3 | – | – | – | – | 2 | – | – | – | – |
| LV | – | – | – | – | 5 | – | – | – | – | – |
| LVI | 8 | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| LVII | 9 | – | – | – | – | 2 | – | – | – | – |
| LVIII | 3 | – | – | – | – | 4 | – | – | – | – |
| LIX | – | 4 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| LX | – | – | – | – | – | – | – | – | 4 | – |
| Total no. of genotypes | 17 | 13 | 16 | 8 | 11 | 22 | 10 | 9 | 9 | 9 |

3. Results

LAB counts on MLOA plates are shown in Table 1. Counts at the end of alcoholic fermentation (stage 0) ranged between 10^2 and 10^6 cfu mL⁻¹, increasing to 10^6 – 10^7 cfu mL⁻¹ during MLF. Important differences in MLF duration were observed between wineries and batches, ranging from 7 to 37 days, with a mean value of 16 days. Although a correlation between counts of LAB at stage 0 and duration of MLF was not observed for all batches, note that in batches BII and CII from the 2006 vintage, where the counts were lowest (1.60×10^2 and 1.50×10^2 cfu mL⁻¹, respectively), MLF was completed in 37 and 32 days, respectively, while in those showing the highest counts, batches CII from the 2007 vintage and DI from 2006, it lasted for a shorter time (11 days).

A total of 652 LAB isolates were obtained from counted MLOA plates and analysed by RAPD-PCR using M13 primer. UPGMA analysis of RAPD-PCR patterns grouped isolates from each batch at each winery into clusters at a minimum similarity level of 82%, which is the value obtained in the reproducibility study (data not shown). The number of genotypes obtained for each winery is shown in Table 1.

Identification of representative isolates from each cluster using 16S-ARDRA, enabled identification of 612 isolates as belonging to *O. oeni*. The remaining non-*Oenococcus* isolates were identified as belonging to *Lactobacillus* (*L.*) *casei*, *L. plantarum*, *L. hilgardii* and *Leuconostoc* (*Lc.*) *mesenteroides* using API 50 CH galleries. *Lc. mesenteroides* was present in each winery at least in one vintage, being therefore the predominant non-*Oenococcus* species, followed by *L. plantarum*. *Lc. mesenteroides* was the only non-*Oenococcus* species isolated at wineries C and D, while *L. plantarum* was present at both vintages at wineries A and E. *L. hilgardii* was present only in 2006 vintage at winery B and *L. casei* did it in the same vintage at wineries A and B.

Joint analysis of RAPD-PCR patterns from the 612 *O. oeni* isolates produced a very large dendrogram containing 60 different profiles (data not shown).

Table 2 shows the number of different *O. oeni* genotypes participating for each vintage and at each winery and the frequency (%) of their appearance, calculated as the number of isolates of each genotype divided by the total number of isolates, and expressed as a percentage. The number of different genotypes identified at each winery ranged from 8 to 22. In wineries A–C, major differ-

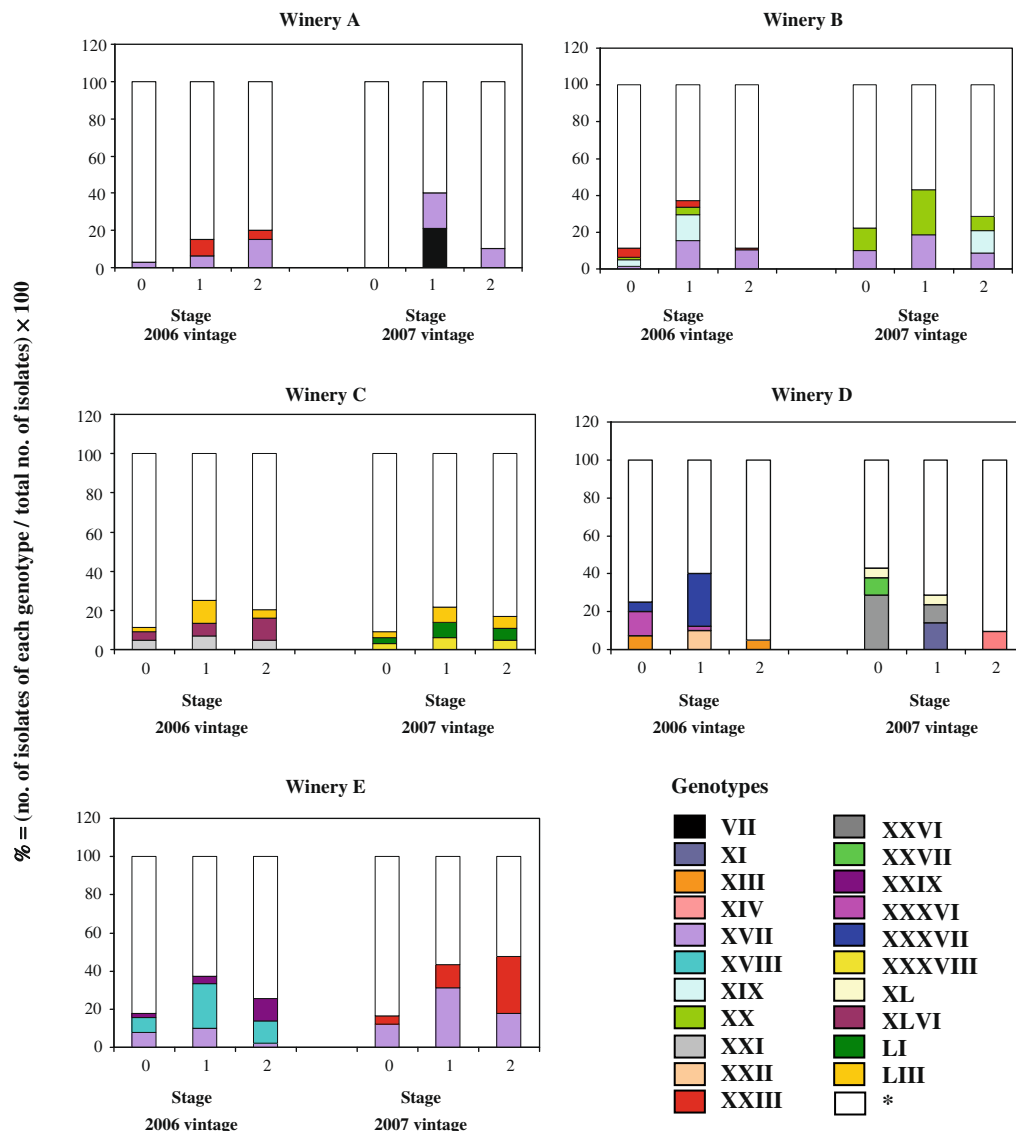


Fig. 1. Frequency of isolation of the genotypes of *O. oeni* genotypes (%) at each stage of MLF and from both vintages. * Genotypes with a percent of participation lower than 10% present have been grouped.

ences were observed in the number of participating genotypes from one year to another, revealing considerable clonal diversity. In all the wineries there was a small number of genotypes that were detected most frequently ($\geq 10\%$) and could thus be described as predominant, and a large number of genotypes whose presence was less than 10%. There was also a small number of genotypes which were present in both vintages, but whose frequency of participation varied from year to year.

Genotypes XVII, XVIII and XXIII were present in at least one vintage in every winery. Genotype XVII was dominant in winery A in both vintages, and in the 2006 vintage in winery B and in the 2007 vintage in winery E. In the case of wineries C and D, genotype XVII was present but as a minority genotype and not in both vintages. Genotype XVIII was present at a lower frequency, except for the 2006 vintage in winery E where it was dominant. When a comparison of coincident genotypes was done for the wineries, it was observed that wineries A–C shared the largest number of genotypes, despite being located in separate provinces. Nine coincident genotypes were obtained for wineries A–B and A–C, while eight coincident genotypes were observed for wineries B and C. Only three genotypes were coincident at wineries A–C.

Fig. 1 shows the population dynamics of predominant *O. oeni* genotypes. Although there were some exceptions, in all the wineries the predominant genotypes persisted through the various stages in each of the two vintages, and even in the various stages of each of the two vintages at each winery. As mentioned previously, genotype XVII was one of the predominant genotypes at wineries A–E, where it was present at all the stages of both vintages, with the exception of stage 0 in the 2007 vintage of winery A. At all the wineries, the number of genotypes in the last two stages was either maintained or decreased slightly (data not shown), which could be attributable to the changes occurring during MLF.

Non-*Oenococcus* isolates were clustered into 19 genotypes, and although they were isolated from all the wineries and from samples taken at all stages, they were more abundant at the beginning of MLF (stages 0 and 1). Only two of these genotypes, belonging to *Lc. mesenteroides*, were present at more than one winery; one of them grouped isolates from wineries A and B and the other grouped isolates from wineries C and E. In no case was any of these 19 genotypes detected in more than one vintage.

4. Discussion

Values for chemical parameters were similar to those reported for Tempranillo wines by Izquierdo, Seseña, Ruiz, and Palop (2007). Scarce differences were observed between wineries that would not explain strain variability from year to year.

Counts for lactic acid bacteria during MLF were similar to those reported by other authors (Lonvaud-Funel, 1999; Ruiz et al., 2008). Major differences were observed in MLF duration, possibly due, among other factors, to different LAB growth. Reguant et al. (2005) reported a correlation between the progress of MLF and the viable LAB population, noting that when LAB populations did not exceed 10^3 cfu mL⁻¹, MLF did not occur. As in many other studies, MLF was more active when the population of LAB was around 10^6 cfu mL⁻¹ (Wibowo, Eschenbruch, Davis, Fleet, & Lee, 1985). Other authors (du Plessis, Dicks, Pretorius, Lambrechts, & du Toit, 2004; Lonvaud-Funel, 1999; Reguant et al., 2005) have also reported that MLF is influenced by factors such as pH, temperature, composition of the wine and even the yeast strains implicated in the alcoholic fermentation.

According to reports on other wines (Davis, Wibowo, Lee, & Fleet, 1985; Renouf, Claisse, & Lonvaud-Funel, 2007), *O. oeni* was the predominant species in MLF of Tempranillo wines, although it was not the only species responsible for the occurrence of sponta-

neous MLF in these wines, because different *Lactobacillus* spp. and *Lc. mesenteroides* were also identified, especially at stage 0 of MLF. The presence of these species during alcoholic fermentation and at the beginning of MLF has been widely reported (du Plessis et al., 2004; Ribéreau-Gayon, Glories, Maujean, & Dubourdieu, 2000; Izquierdo, Ruiz, Seseña, & Palop, 2009), and also that their viability decreases significantly as MLF progresses, due to the chemical changes that take place.

RAPD-PCR made it possible to clearly discriminate the different *O. oeni* genotypes. Like some other authors (Guerrini et al., 2003; Izquierdo et al., 2009), we observed some coincident genotypes in samples originating from different provinces in the same region, which suggests a geographical distribution of the *O. oeni* strains that grow spontaneously in wine.

Although the variability of genotypes was high for both vintages at each winery, coincident genotypes were found, and in some cases were the most abundant. Similar results were reported by Reguant et al. (2005) in a study of population dynamics of *O. oeni* strains, and by Gutierrez et al. (1999) for yeast populations in a winery in La Rioja (Spain). This could be the result of successful adaptation to winery conditions.

According to Sabaté, Cano, Querol, and Guillamón (1998), genotypes XVII, XVIII and XXIII could be used in a selection programme because in addition to being present at all wineries, they were dominant in some vinifications and were present in successive vintages at some wineries.

The genetic characterization of a large number of *O. oeni* isolates from different wineries located in the same geographical area of Castilla-La Mancha (Spain) using RAPD-PCR shows that there is a coincident population of *O. oeni* genotypes. The persistent presence of these genotypes in all the wineries suggests a potential industrial utility, and therefore they need to be technologically characterized for selection as a starter culture.

Acknowledgements

The authors thank the *Consejería de Educación y Ciencia* of the *Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha* (JCCM) and the *Ministerio de Educación y Ciencia* (INIA) for financial support (projects PCC 05–003–2 and RM 2006–00011–C02–02). P. Ruiz is supported by a grant from the *Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha*.

References

- Agouridis, N., Bekatorou, A., Nigam, P., & Kanellaki, M. (2005). Malolactic fermentation in wine with *Lactobacillus casei* cells immobilized on delignified cellulosic material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2546–2551.
- Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J. M., & Esteve-Zarzoso, B. (2008). Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Journal of Food Microbiology*, 25, 849–856.
- Davis, C. R., Wibowo, D., Lee, T. H., & Fleet, G. H. (1985). Growth and metabolism of lactic acid bacteria during fermentation and conservation of some Australian wines. *Food Technology in Australia*, 38, 35–40.
- du Plessis, H. W., Dicks, L. M. T., Pretorius, I. S., Lambrechts, M. G., & du Toit, M. (2004). Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 19–29.
- Guerrini, S., Bastianini, A., Blaiotta, G., Granchi, L., Moschetti, G., Coppola, S., et al. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical Italian wines. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 1–14.
- Gutierrez, A. R., Santamaría, P., Epifanio, S., Garijo, P., & López, R. (1999). Ecology of spontaneous fermentation in one winery during 5 consecutive years. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 411–415.
- Harrigan, W. F., McCance, M. E. (1976). In *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. New York: Academic Press.
- Izquierdo, P. M., Ubeda, J. F., & Briones, A. I. (1997). Study of the karyotype of wine yeasts isolated in the region of Valdepeñas in two consecutive vintages. *Food Microbiology*, 14, 221–225.
- Izquierdo, P. M., Seseña, S., Ruiz, P., & Palop, M. I. (2007). Producción de ácidos volátiles y degradación de ácido cítrico por cepas de *Oenococcus oeni* aisladas de la fermentación maloláctica espontánea de vinos Cencibel elaborados en Castilla-La Mancha. *Viticulture and Enology Profesional*, 111, 37–42.

- Izquierdo, P. M., Ruiz, P., Seseña, S., & Palop, M. Ll. (2009). Ecological study of lactic acid microbiota isolated from Tempranillo wines of Castilla-La Mancha. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.04.001.
- Larisiki, M., Claus, H., & Köning, H. (2008). Pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of *Oenococcus oeni* isolates from different wine-growing regions in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 171–176.
- Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 317–331.
- Maicas, S. (2001). The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 35–39.
- Reguant, C., Carreté, R., Constantí, M., & Bordons, A. (2005). Population dynamics of *Oenococcus oeni* strains in a new winery and the effect of SO₂ and yeast strain. *FEMS Microbiology Letters*, 246, 111–117.
- Renouf, V., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2007). Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 149–164.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2000). The Chemistry of wine stabilization and treatments. In *Handbook of enology* (pp. 140). Chichester, UK: Wiley.
- Rodas, A. M., Ferrer, S., & Pardo, I. (2003). 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 412–422.
- Ruiz, P., Izquierdo, P. M., Seseña, S., & Palop, M. Ll. (2008). Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiology*, 25, 942–948.
- Sabaté, J., Cano, J., Querol, A., & Guillamón, J. M. (1998). Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: Analysis for two consecutive years. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 452–455.
- Santamaría, P., Garijo, P., López, R., Tenorio, C., & Gutiérrez, A. R. (2005). Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: Effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 49–56.
- Vauterin, L., & Vauterin, P. (1992). Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *European Microbiology*, 1, 37–41.
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., Fleet, G. H., & Lee, T. H. (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine. A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 302–313.



**Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains
according to their oenological properties and vinification
results**

Ruiz, P., Izquierdo, P.M., Seseña, S. y Palop, M.LI.

Int. J. Food Microbiol. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.027



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results

Patricia Ruiz^a, Pedro Miguel Izquierdo^b, Susana Seseña^a, María Llanos Palop^{a,*}

^a Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Universidad de Castilla-La Mancha, Avda. Carlos III s/n, 45071, Toledo, Spain

^b Instituto de la Vid y del Vino de Castilla-La Mancha, Crta. Toledo-Albacete s/n, 13700, Tomelloso (Ciudad Real), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 July 2009

Received in revised form 13 November 2009

Accepted 26 November 2009

Available online xxxx

Keywords:

Tempranillo wine

Malolactic fermentation

Oenococcus oeni

RAPD-PCR

ABSTRACT

The goal of this study is to carry out a characterization of 84 *Oenococcus oeni* strains isolated from Tempranillo wine samples taken at the cellars in Castilla-La Mancha, in order to select those showing the highest potential as oenological starter cultures. Various oenological properties were analyzed and the ability of some of these strains to grow and undergo MLF in simulated laboratory microvinifications was tested. Twenty-two strains were selected on the basis of fermentation assays and the eight that produced the best results in the chemical analysis of the wines were chosen for further assays. None of the eight strains was either able to produce biogenic amines or displayed tannase or anthocyanase activities. On the other hand all presented activity against *p*-NP- β -Glucopyranoside, *p*-NP- α -Glucopyranoside and *p*-NP- β -xylopyranoside. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR was used to determine the colonizing ability of the inoculated strains. C22L9 and D13L13 strains showed the highest implantation values. On the basis of this characterization, two strains have been selected which are suitable as starter cultures for MLF of Tempranillo wine. Use of these strains will ensure that MLF proceeds successfully and gives retention of the organoleptic characteristics of wines made in Castilla-La Mancha.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Malolactic fermentation (MLF) is one of the main stages in the making of red wine. In this process, lactic acid bacteria (LAB) are present spontaneously or added intentionally after alcoholic fermentation, decarboxylate malic acid to lactic acid, which results in a deacidification and a greater microbiological stability of the wine. In addition, many other reactions change the organoleptic properties of wines and make MLF beneficial (Lonvaud-Funel, 1999).

Oenococcus oeni is the main species identified during spontaneous MLF because of its higher tolerance to adverse wine conditions (Lonvaud-Funel, 1999). For that reason commercial starter cultures (i.e. Lallemann products Lalvin VP41, PN4; Chr. Hansen products Vinaflores oenos) for MLF are made up of strains of this species.

Induction of MLF by inoculation with commercially available strains of *O. oeni* is not always successful, because wine is a very harsh environment for bacterial growth (Coucheney et al., 2005). Thus, the use of an autochthonous starter culture well-adapted to the conditions of a specific wine-producing area has been recommended (Henick-Kling et al., 1989; Izuagbe et al., 1985; Nielsen et al., 1996).

The development of starter cultures for food fermentations is a multidisciplinary approach requiring not only an ecological study of

man-made food ecosystems (Vogel et al., 2002) but also the characterization of useful technological and physiological features of predominant strains in order to select the ones that are potentially most suitable for industrial applications. Nowadays, selection of strains for wine inoculation is essentially based on the survival of the strains in wine and the consumption of malic acid (Henick-Kling et al., 1989). However, many other useful oenological properties need to be assayed, such as the presence of diverse enzymatic activities, capacity to produce biogenic amines or resistance to freeze-drying (Fayed et al., 1986; Moreno-Arribas et al., 2003; Vaquero et al., 2004).

During vinification the activity of numerous enzymes (glycosidases and tannase) has been found to be essential to stimulate aroma development and other processes responsible for sensory changes. For instance, the presence of glycosidases has been reported to have a major impact on the sensory profile of wines, since the aromatic compounds in the glycosidic form do not realize most of their aromatic potential (Boido et al., 2002; Grimaldi et al., 2005a).

Similarly, the presence of tannin-degrading activity would be important since oxidation of tannins by contact with the air produces undesirable turbidity, which is a serious quality problem. The use of tannases from plant, animal or microbial sources (fungi and bacteria) has been proposed as a solution to this problem (Aguilar and Gutierrez-Sanchez, 2001), and it would be extremely useful to find an *O. oeni* strain able to hydrolyze these compounds (Vaquero et al., 2004).

Conversely, the presence of anthocyanases is undesirable in starter cultures because the resulting compounds – anthocyanidins – are less

* Corresponding author. Tel.: +34 925 265 716; fax: +34 925 268 840.

E-mail address: MaríaLlanos.Palop@uclm.es (M.L. Palop).

stable and readily converted to brown or colourless compounds (Blom, 1983; Huang, 1955).

Biogenic amines are compounds which detract the quality and acceptability of wines, to the extent that they may even render them unfit for consumption (Moreno-Arribas et al., 2003). Different results have been reported for biogenic amine production by *O. oeni* and it is therefore most desirable to be able to avoid formation of these amines during MLF (Costantini et al., 2006; Landete et al., 2007).

Another important characteristic for commercial starters is the resistance to freeze-drying, since this is the most commonly-used way of preserving and distributing these cultures. The effect of freeze-drying on the viability and activity of some bacteria has been reported by several authors (Fayed et al., 1986; Valdez et al., 1985).

The aim of this study was to characterize 84 *O. oeni* strains isolated from Tempranillo wine samples on the basis of technological criteria, in order to select those showing the highest potential as oenological starter cultures. Although other studies of technological characterization of *O. oeni* have been reported, our study reports new information on a diversity of these properties.

2. Materials and methods

2.1. Microbial strains and growth conditions

Eighty-four *O. oeni* strains were analyzed; they were representative of each major cluster obtained in the dendrograms from a previous biodiversity study (Izquierdo et al., 2009). Before use, pure cultures kept as frozen stocks at -80°C , were revitalized by culturing on MLO (*Leuconostoc oenos* Medium, Scharlab, Barcelona, Spain) agar supplemented with tomato juice (10% v/v) (Scharlab, Barcelona, Spain). Plates were incubated anaerobically (Gas Pack System, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) for five days at 30°C .

2.2. Characterization of the strains

2.2.1. Fermentation assays

Tempranillo wine (250 mL) was sterilized by filtration ($0.2\ \mu\text{m}$) and inoculated (1%) with a culture of the assayed strain in MLO broth supplemented with 10% (v/v) tomato juice, to reach an initial population of 10^6 cfu/mL. Cultures were incubated at 22°C until consumption of malic acid (≤ 0.2 g/L). Samples were taken daily from day 6 post-inoculation until the end of MLF, to determine malic acid and lactic acid content. A non-inoculated wine was used as a control. Fermentations were carried out in duplicate with the eighty-four *O. oeni* strains.

Samples were taken before inoculation and at the end of MLF were analyzed for a number of chemical parameters as described below and for *O. oeni* counts on MLO agar plates, as described above. Strains selected from the results of these fermentation assays were used for the following analyses.

2.2.2. Detection of enzyme activities

Three glycosidase activities (α and β glucosidases and xylosidase) were evaluated following the procedure outlined by Grimaldi et al. (2005a). McIlvane buffer (0.1 M citric acid and 0.2 M K_2HPO_4 ; pH = 5.0) (Dawson et al., 1986) and the substrates *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside and *p*-nitrophenyl xylopyranoside, all purchased from Sigma, were used. *p*-Nitrophenol released was determined in a Beckman DU-530 spectrophotometer at 400 nm.

An assay simulating wine conditions was carried out to assess the influence of pH and ethanol content on glycosidase activities. McIlvane buffer added with 0.1 N HCl to reach pH 3.5 and ethanol (Panreac, Madrid, Spain) to reach a concentration of 14% (v/v) was used. All analyses were performed in duplicate.

Tannase activity using methyl-galate (Sigma, Madrid, Spain) as substrate was determined by spectrophotometry and visual reading

as described by Osawa and Walsh (1993). Green to brown coloration of the medium was judged a positive result in the visual reading. In the spectrophotometry assay, 1 mL suspension was removed after incubation, centrifuged ($13,000 \times g/5$ min, 4°C) and the supernatant measured at 440 nm. An absorbance value up to 0.5 was considered a positive result.

To detect anthocyanase activity, cells from 1.5 mL of a MLO broth culture were recovered by centrifugation ($12,000 \times g/5$ min, 4°C) and resuspended in 1.5 mL of Tempranillo wine. Wine was incubated at 4°C and decolorization, measured as a decrease in absorbance at 520 nm, was monitored after 7 and 30 days of incubation (Manzanares et al., 2000).

2.2.3. Determination of biogenic amine-forming capacity

Amino acid-decarboxylase activity was assessed both qualitatively, according to the method described by Bover-Cid and Holzapfel (1999), and by detecting the presence of decarboxylase genes by PCR reactions.

The decarboxylase medium used was the one described by Majjala (1993), containing 1% (w/v) of each precursor amino acid, L-histidine monohydrochloride, L-ornithine monohydrochloride, tyrosine disodium salt and L-lysine monohydrochloride and 0.005% (w/v) pyridoxal-5-phosphate, as a cofactor for the decarboxylation reaction. All these reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Plates were incubated at 30°C in anaerobic conditions for 7 days. Positive reactions were recorded when a purple colour appeared on the plates or tyrosine precipitates disappeared around the colonies (Bover-Cid and Holzapfel, 1999).

To detect the histidine decarboxylase (*hdc*), ornithine decarboxylase (*odc*) and tyrosine decarboxylase (*tdc*) genes, genomic DNA was extracted from a single colony on MLOA following the procedure described by Rodas et al. (2003). The presence of these genes was assayed by specific-PCR reactions following the procedure described by Marcobal et al. (2005). Primer sets JV16HC and JV17HC (Le Jeune et al., 1995), 3–16 (Marcobal et al., 2004) and P1-rev and P2-for (Lucas and Lonvaud-Funel, 2002) were used to detect *hdc*, *odc* and *tdc* genes respectively.

Amplification reactions were carried out using a Thermal Cycler 2400 (Perkin Elmer Co, USA), after that amplification products were separated by electrophoresis on 1.5% (w/v) agarose gels (Pronadisa, Spain). 100 bp-ladder and Kb-ladder from Biotools (Madrid, Spain) were used as molecular size standards. The program Kodak Digital Science 1-D was used to determine the size of the bands.

2.2.4. Monitoring of microbial growth through controlled fermentations: study of the colonizing ability of the inoculated strains

Flasks containing 100 mL of Tempranillo wine were inoculated and incubated as described in the fermentation assays. Each strain was analyzed in duplicate (V1 and V2) and two non-inoculated flasks were used as control.

Samples of wine were taken under aseptic conditions, immediately after inoculation (T0) and after 3, 6 and 9 days of incubation (T1, T2 and T3). Samples were analyzed by serial dilution into sterile physiological saline (0.9% w/v NaCl) solution and spread onto MLOA plates supplemented with sodium azide (50 mg/mL) and cycloheximide (100 mg/mL) to suppress growth of acetic acid bacteria and yeast respectively. Plates were incubated anaerobically for 5 days at 30°C . For each sample, thirty-five isolated colonies from countable plates were picked at random and purified by successive streaking onto the same medium.

To calculate the colonizing ability, pure cultures and the inoculated strains were typed by RAPD-PCR. DNA extraction was carried out as described by Rodas et al. (2003). A colony was suspended in 10 μL sterile milli-Q water and 1 μL of the suspension was used for PCR reactions.

RAPD-PCR reactions were performed in a total volume of 20 μL according to the procedure described by Ruiz et al. (2008). The primer M13 (5'-GAGGGTGGCGGTCT-3') purchased from Bonsai Technologies

Group (Madrid, Spain) was used. Amplification was carried out using a 2400 Perkin Elmer thermal cycler (Perkin Elmer Co., USA). To determine the minimum percentage of similarity (r) necessary for strain discrimination, a reproducibility study was carried out on eight isolates as described by Ruiz et al. (2008).

RAPD-PCR gels were visualized by UV trans-illumination at 254 nm and photographed with a KODAK DC290 Zoom Digital Camera. The patterns were normalized and further processed using the GelCompar version 4.0 pattern analysis software package, (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) (Vauterin and Vauterin, 1992). Isolates were grouped using the Dice coefficient and single linkage cluster analysis. Patterns were compared and the implantation value was calculated as the number of colonies with the specific RAPD-PCR pattern divided by the total number of colonies picked, and expressed as a percentage (Ruiz-Barba et al., 1994).

2.2.5. Stability of lyophilized cultures

Cultures on MLO broth supplemented with tomato juice were incubated aerobically at 30 °C until O.D.₆₅₀ ≥ 1.3. Counts were performed on MLOA plates as previously described. Two volumes (10 mL each) were centrifuged at 2000×g for 15 min at 4 °C and pellets were washed twice with a sterile buffer (50 mM KH₂PO₄). Pellets were then resuspended in the same buffer fortified with 4% lactose as a cryoprotectant and dispensed in cryoscopic vials. Vials were frozen at −80 °C and freeze-dried for 24 h at −40 °C using a FTS System (BioPharm Division, Stone Ridge, New York, USA). Freeze-dried cells were hydrated in MLO broth and counts were performed as described above. Cell stability was established by comparison of counts obtained before and after freeze-drying.

2.3. Chemical analysis of wines

Wines used in the fermentation assays were analyzed both before inoculation and after the conclusion of MLF, for the following chemical parameters: glucose + fructose content, total acidity measured as tartaric acid content, pH, L-malic acid, L-lactic acid and citric acid content, volatile acidity measured as acetic acid content. Alcohol content and total and free SO₂ content were also analyzed in wines before inoculation. In

all cases the procedures described in the European Union's Official Methods of wine analysis (European Union, 1990) were followed.

Wines made using selected strains (B12L4, B23L9, C22L9, D13L13, E20L2, F14L10, G13L3 and I24L7) were further analyzed for the most important minor volatile compounds (acetaldehyde, ethyl lactate, ethyl acetate, isoamyl acetate, methanol, 2,3-butanedione, and 3-OH-2-butanone) as described by Izquierdo et al. (2008).

2.4. Sensory analysis

A preliminary sensory analysis in order to know if differences were appreciated between wines obtained from a commercial strain and those obtained from the selected strains was performed.

Flasks containing 5 L of Tempranillo wine were inoculated with a culture of the finally selected strains (C22L9 and D13L13) and a commercial strain (PN4, Danstar Ferment A.G.) and incubated as reported above. When MLF had concluded, wines were treated following the industrial procedure, before bottling.

A triangular test (ISO Standard 4120, 1983) was employed. Three samples for each set were presented simultaneously, of which two of them were identical. Each wine sample was analyzed by 12 assessors, 60% women and 40% men, during three different sessions. Each assessor was asked to identify the different samples and to select the preferred one. The sample sets were randomly distributed among the assessors. The test supervisor chose a significance level of 5%.

2.5. Statistical analysis

The paired Student *t*-test was used to determine significant differences between the results for chemical analysis. The SPSS 12.0 program was used to calculate means and standard deviations of the results.

3. Results

Results from fermentation assays performed on the 84 *O. oeni* strains showed that 22 strains were able to exhaust the malic acid content in the wine during the first 10 days of incubation (Table 1),

Table 1

Mean values and standard deviation of the chemical parameters analyzed in non-inoculated Tempranillo wine and wine fermented with each of the 22 selected strains of *Oenococcus oeni*.

| Strain | MLF duration (days) | G + F (g/L) | | Total acidity (g/L) | | pH | | L-malic acid (g/L) | | L-lactic acid (g/L) | | Citric acid (g/L) | | Volatile acidity (g/L) | |
|---------------------|------------------------|----------------|------|------------------------|------|------|------|-----------------------|------|------------------------|------|----------------------|------|---------------------------|------|
| | Mean | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD |
| Non-inoculated | 7.00 | 0.30 | 0.12 | 5.27 | 0.14 | 3.58 | 0.05 | 2.36 | 0.15 | 0.07 | 0.03 | 0.34 | 0.01 | 0.31 | 0.04 |
| B12L4 ^a | 7.00 | 0.32 | 0.01 | 4.05 | 0.01 | 3.79 | 0.01 | 0.08 | 0.00 | 1.84 | 0.11 | 0.18 | 0.03 | 0.37 | 0.03 |
| B13L4 | 7.00 | 0.23 | 0.12 | 3.93 | 0.02 | 3.81 | 0.01 | 0.02 | 0.00 | 1.81 | 0.06 | 0.03 | 0.00 | 0.51 | 0.04 |
| B21L6 | 7.00 | 0.23 | 0.01 | 3.90 | 0.13 | 3.87 | 0.03 | 0.09 | 0.00 | 1.87 | 0.01 | 0.03 | 0.00 | 0.56 | 0.01 |
| B23L9 ^a | 7.00 | 0.33 | 0.01 | 3.90 | 0.01 | 3.71 | 0.00 | 0.13 | 0.01 | 1.62 | 0.01 | 0.18 | 0.01 | 0.39 | 0.00 |
| C12L5 | 9.00 | 0.14 | 0.00 | 4.05 | 0.21 | 3.80 | 0.01 | 0.13 | 0.05 | 1.70 | 0.10 | 0.07 | 0.01 | 0.46 | 0.03 |
| C13L12 | 8.00 | 0.22 | 0.00 | 3.88 | 0.07 | 3.78 | 0.01 | 0.03 | 0.02 | 1.96 | 0.01 | 0.08 | 0.02 | 0.53 | 0.00 |
| C21L3 | 7.00 | 0.26 | 0.01 | 3.89 | 0.02 | 3.75 | 0.04 | 0.12 | 0.06 | 1.90 | 0.01 | 0.03 | 0.00 | 0.44 | 0.01 |
| C22L9 ^a | 7.00 | 0.24 | 0.00 | 3.86 | 0.03 | 3.74 | 0.01 | 0.04 | 0.00 | 1.95 | 0.05 | 0.29 | 0.01 | 0.44 | 0.01 |
| D13L13 ^a | 7.00 | 0.09 | 0.01 | 3.98 | 0.01 | 3.79 | 0.00 | 0.11 | 0.01 | 1.59 | 0.01 | 0.17 | 0.01 | 0.47 | 0.01 |
| D21L8 | 8.00 | 0.16 | 0.00 | 4.01 | 0.11 | 3.82 | 0.02 | 0.07 | 0.05 | 1.66 | 0.01 | 0.08 | 0.01 | 0.45 | 0.01 |
| D23L15 | 7.00 | 0.16 | 0.01 | 3.99 | 0.01 | 3.80 | 0.01 | 0.14 | 0.03 | 1.56 | 0.04 | 0.08 | 0.01 | 0.44 | 0.04 |
| D23L6 | 7.00 | 0.14 | 0.01 | 3.86 | 0.01 | 3.81 | 0.00 | 0.12 | 0.01 | 1.66 | 0.04 | 0.05 | 0.00 | 0.44 | 0.01 |
| E11L7 | 10.00 | 0.27 | 0.04 | 3.70 | 0.16 | 3.72 | 0.01 | 0.09 | 0.05 | 1.61 | 0.10 | 0.04 | 0.02 | 0.46 | 0.03 |
| E20L2 ^a | 9.00 | 0.33 | 0.00 | 3.88 | 0.00 | 3.71 | 0.00 | 0.15 | 0.06 | 1.60 | 0.05 | 0.18 | 0.01 | 0.43 | 0.02 |
| F10L4 | 8.00 | 0.27 | 0.00 | 3.87 | 0.01 | 3.60 | 0.21 | 0.10 | 0.01 | 1.79 | 0.02 | 0.05 | 0.00 | 0.60 | 0.04 |
| F14L10 ^a | 7.00 | 0.12 | 0.00 | 4.04 | 0.01 | 3.78 | 0.00 | 0.10 | 0.04 | 1.61 | 0.01 | 0.20 | 0.00 | 0.42 | 0.01 |
| G13L3 ^a | 7.00 | 0.20 | 0.00 | 3.98 | 0.01 | 3.63 | 0.00 | 0.05 | 0.00 | 1.82 | 0.01 | 0.26 | 0.02 | 0.40 | 0.04 |
| G13L4 | 7.00 | 0.21 | 0.01 | 3.93 | 0.00 | 3.72 | 0.00 | 0.08 | 0.01 | 1.78 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.63 | 0.01 |
| I21L1 | 7.00 | 0.14 | 0.01 | 3.94 | 0.18 | 3.76 | 0.05 | 0.11 | 0.01 | 1.87 | 0.05 | 0.01 | 0.00 | 0.53 | 0.01 |
| I24L7 ^a | 10.00 | 0.34 | 0.01 | 3.87 | 0.03 | 3.73 | 0.01 | 0.08 | 0.01 | 1.72 | 0.11 | 0.18 | 0.01 | 0.44 | 0.01 |
| J20L8 | 7.00 | 0.30 | 0.01 | 4.12 | 0.07 | 3.79 | 0.06 | 0.13 | 0.11 | 1.64 | 0.02 | 0.05 | 0.00 | 0.54 | 0.18 |
| J24L7 | 7.00 | 0.22 | 0.02 | 3.95 | 0.01 | 3.72 | 0.01 | 0.12 | 0.00 | 1.87 | 0.04 | 0.02 | 0.01 | 0.49 | 0.01 |

^a Strains selected on the basis of the values for volatile acidity and citric acid.

Table 2
Mean values and standard deviation of some minor volatile compounds analyzed in non-inoculated Tempranillo wine and wine fermented with each of 8 selected strains of *Oenococcus oeni*.

| Strain | Acetaldehyde (mg/L) | | Ethyl lactate (mg/L) | | Ethyl acetate (mg/L) | | Isoamyl acetate (mg/L) | | Methanol (mg/L) | | 2,3-butanedione (mg/L) | | 3-OH-2-butanone (mg/L) | |
|----------------|---------------------|------|----------------------|------|----------------------|------|------------------------|------|-----------------|------|------------------------|------|------------------------|------|
| | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD |
| Non-inoculated | 7.60 | 0.46 | 4.37 | 0.22 | 6.93 | 0.72 | 0.20 | 0.04 | 87.32 | 2.62 | 1.99 | 0.13 | 1.48 | 0.03 |
| B12L4 | 1.92 | 0.28 | 12.41 | 1.28 | 5.91 | 0.79 | 0.16 | 0.05 | 85.76 | 6.83 | 11.70 | 0.83 | 3.17 | 0.16 |
| B23L9 | 2.27 | 0.17 | 15.43 | 0.03 | 8.17 | 0.54 | 0.23 | 0.04 | 90.81 | 0.42 | 12.30 | 0.08 | 3.88 | 0.25 |
| C22L9 | 1.41 | 0.11 | 17.98 | 0.66 | 5.89 | 0.55 | 0.15 | 0.03 | 89.16 | 1.98 | 4.02 | 0.03 | 1.41 | 0.31 |
| D13L13 | 1.94 | 0.09 | 5.55 | 0.41 | 5.70 | 0.07 | 0.17 | 0.01 | 86.20 | 4.24 | 5.60 | 0.01 | 1.01 | 0.18 |
| E20L2 | 1.22 | 0.79 | 19.58 | 0.85 | 4.20 | 3.59 | 0.14 | 0.09 | 90.40 | 4.33 | 4.07 | 0.46 | 4.83 | 0.02 |
| F14L10 | 1.22 | 0.22 | 6.63 | 0.40 | 6.34 | 0.48 | 0.19 | 0.03 | 91.43 | 4.71 | 2.40 | 0.07 | 2.14 | 0.14 |
| G13L3 | 1.44 | 0.16 | 6.65 | 0.17 | 6.44 | 0.14 | 0.21 | 0.02 | 99.59 | 1.33 | 3.30 | 0.01 | 2.97 | 0.12 |
| I24L7 | 1.34 | 0.09 | 6.35 | 0.51 | 6.40 | 0.02 | 0.21 | 0.02 | 94.94 | 5.01 | 2.70 | 0.03 | 0.15 | 0.10 |

although the duration of MLF depended on the strains. In the case of the remaining 62 strains, malic acid content after ten days of incubation was higher than 0.2 g/L and they were therefore rejected for this study. Counts of these 62 strains on MLOA plates (data not shown) showed a decrease of around 10^3 cfu/mL at the end of MLF, which would account for the failure to consume malic acid.

Table 1 shows the results for the chemical parameters analyzed in non-inoculated wines and those inoculated with the 22 selected strains. An important decrease of malic acid content and the subsequent increase of pH, volatile acidity and lactic acid content and decrease of total acidity and citric acid contents can be observed. Alcohol and total and free SO_2 contents in the wine before inoculation were 13.02%, 48 mg/L and 22 mg/L (v/v) respectively.

On the basis of the values for volatile acidity and citric acid, a second screening was carried out with a selection of eight strains. Wines from fermentation assays made with these strains were further analyzed for

minor volatile compounds (Table 2). As compared with the control, acetaldehyde concentration decreased, while ethyl lactate and 2,3-butanedione concentrations increased, although differences among strains were observed. Concentrations of the remaining analyzed compounds increased or decreased depending on the strains.

When these eight selected strains were analyzed for tannase or anthocyanase activities, none was found in any of them. Results for glycosidases (α and β glucosidases and xylosidase) assayed at pH 5.0 are shown in Fig. 1a. All strains possessed detectable activity against *p*-NP- β Glu, *p*-NP- α Glu and *p*-NP- β xylopyranoside, with strain B23L9 showing the highest values of all these activities. Xylosidase activity presented the lowest value in all cases, and for five of the strains α -glucosidase activity was greater than β -glucosidase activity.

When glycosidase activities were assayed at pH 3.5 with 14% (v/v) ethanol, decreases ranging between 38% and 99% were recorded (Fig. 1b), xylosidase activity being the most affected.

Determination of amino acid-decarboxylase activity on agar plates containing the precursor amino acid, showed that none of the strains tested produced a change of colour on the plates. These results were confirmed when PCR reactions were performed to detect histidine decarboxylase, ornithine decarboxylase and tyrosine decarboxylase genes.

In the study of colonizing ability, counts immediately after inoculation (T_0) ranged between 1.35×10^5 and 1.76×10^6 cfu/mL, increasing to 1.80×10^6 – 4.32×10^7 cfu/mL at 9 days of incubation (T_3) (data not shown). A total of 1260 isolates were obtained, 140 from samples taken for each strain and 140 from the controls. Dendrograms were constructed from the cluster analysis of the RAPD-PCR patterns of the isolates and of the inoculated strain (data not shown). The value for the similarity coefficient ($r = 65\%$) derived from the reproducibility study

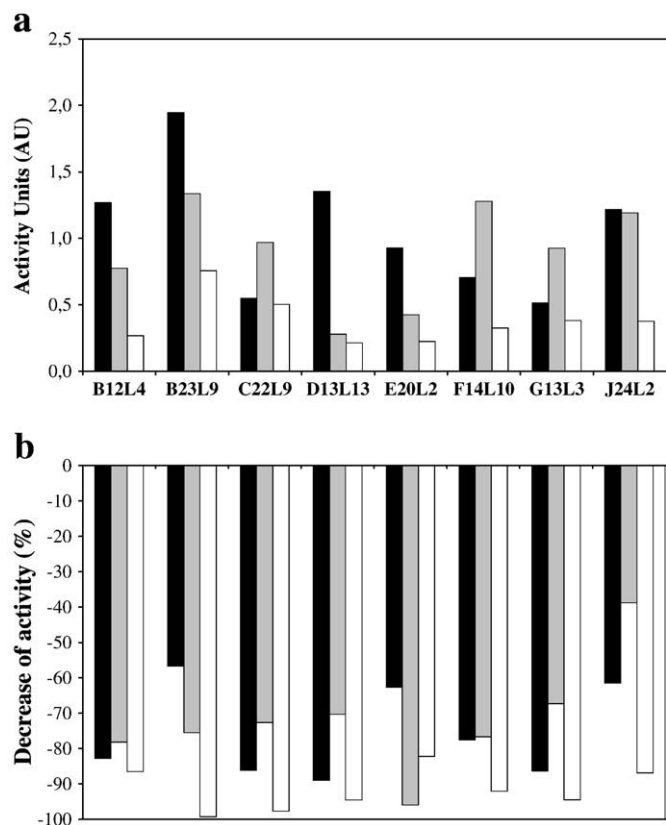


Fig. 1. Glycosidase activities (■ α -glucosidase, ■ β -glucosidase and □ xylosidase) in strains of *Oenococcus oeni* assayed at pH=5 without ethanol (a) and % decrease occurred at pH=3.5 and 14% (v/v) ethanol (b).

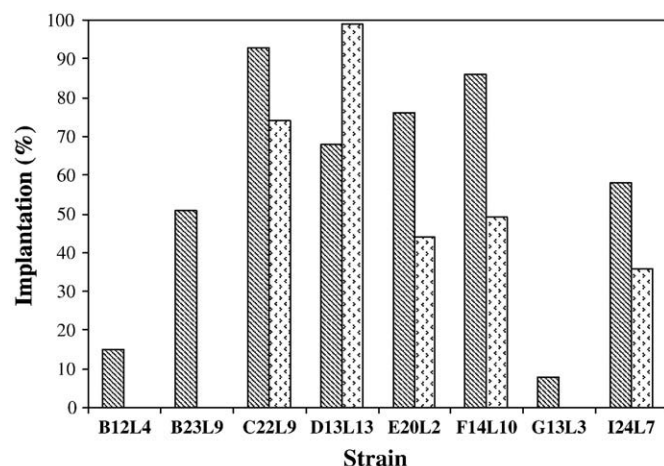


Fig. 2. Implantation values (%) of the strains of *Oenococcus oeni* at both assays. ▨ V1, ▤ V2.

was applied to calculate the implantation values (%) for all strains in each of the assays performed (V1 and V2) (Fig. 2). Strains C22L9 and D13L13 were able to colonize both fermentations, attaining a high percent implantation, while strains B12L4 and G13L3 did not or attained only a very low percentage.

Only the strains showing the best behaviour in the colonizing ability study (strains C22L9 and D13L13) were assayed for stability to freeze-drying. Counts on MLO agar plates of cultures before and after freeze-drying were of the same order of magnitude, suggesting that cell viability was not affected. In order to confirm this result, further industrial-scale freeze-drying assays are being carried out by the company Danstar Ferment A.G.

The results of the triangular test with wines made with strains C22L9 and D13L13 and the commercial strain showed that 8 of the 12 assessors correctly identified the wines obtained from each of the strains. According to ISO Standard 4120, it can be concluded that significant differences between the samples exist, at a significance level of 95%. Wine made with strain C22L9 was preferred by 65% of assessors.

4. Discussion

In the present study we characterized 84 *O. oeni* strains for selection as starter cultures. To achieve this goal we carried out fermentations, which showed important differences between strains. Some of these were not able to degrade malic acid after ten days of incubation, probably as a consequence of their lower tolerance to alcohol and SO₂, and were then rejected. Chemical analysis of the wines made with the 22 first selected strains showed similar values for all the wines irrespective of the inoculated strain. Values obtained for chemical parameters were consistent with those reported by Izquierdo et al. (2005) for wine from the same grape variety.

Strains showing lower citrate degradation were chosen for the following assays since, it has been reported that high citrate degradation produces an increase in volatile acidity that, reaching values ≥ 0.8 g/L, causes an important damage in the sensorial quality of wines (Bartowsky and Henschke, 2004; Henick-Kling, 1995).

Strains E20L2 and C22L9, showed the largest increases in ethyl lactate concentration, important by-products in the metabolism of lactic acid bacteria, lending wines highly appreciated milky notes and a sensation of volume (Davis et al., 1985).

As reported by other authors (Izquierdo et al., 2008; Laurent et al., 1994), 2,3-butanedione was also produced during MLF. This compound gives the wine aromatic complexity, contributing positively to aroma and organoleptic quality, though concentrations above 5–7 mg/L are undesirable for wines (Martineau and Henick-Kling, 1995). In this study, only two strains produced higher quantities of this compound, while strains E20L2 and C22L9 produced an intermediate concentration.

In concordance with the results from Vaquero et al. (2004) for *O. oeni* strains, our eight selected strains showed neither tannase nor anthocyanase activities. These authors only found tannase-positive isolates belonging to *Lactobacillus plantarum* species.

It is important to reiterate the importance of studying glycosidase activities in the selection process considering the consequences of their presence on the organoleptic quality of wines (de Revel et al., 1999; Grimaldi et al., 2005a). Numerous studies have investigated the glycosidase activity of *O. oeni* strains demonstrating a range of capabilities (McMahon et al., 1999; Grimaldi et al., 2000; Boido et al., 2002; Barbagallo et al., 2004; D'Incecco et al., 2004). Mirroring recent findings glycosidase activities were widely distributed among the *O. oeni* assayed, with most strains acting on several of the substrates tested. Values for these activities were of approximately the same order of magnitude as those reported for *O. oeni* in other studies (Grimaldi et al., 2005a,b). pH and ethanol content considerably altered glycosidase activity for the majority of the *O. oeni* strain and substrate combinations.

Although no biogenic amine production was detected in the assays, it should be confirmed on an industrial-scale elaboration, because changes in the conditions of growth could influence these results. Different results have been reported for biogenic amine production by *O. oeni*. In the case of histamine, there have been discrepancies among authors; while some reported no histamine production (Costantini et al., 2006; Moreno-Arribas et al., 2003), others found that the presence of *O. oeni* histamine producing strains is not rare (Coton et al., 2004; Guerrini et al., 2002; Landete et al., 2007). On the other hand, there has been considerable coincidence among authors regarding tyramine-producing and cadaverine-producing abilities, both of which are scarce among *O. oeni* strains and seem to be more frequent in other LAB species present in wines (Landete et al., 2007; Moreno-Arribas et al., 2003; Rivas et al., 2006).

The ability of different *O. oeni* strains to grow and undergo MLF in simulated laboratory microvinifications was tested by studying their population dynamics using RAPD-PCR. This method has already proven its utility in studying the population dynamics of unknown sets of autochthonous bacterial strains (Reguant et al., 2005; Seseña et al., 2005). Strains C22L9 and D13L3 showed the greatest ability to colonize the fermentations, and their stability after freeze-drying was excellent.

In addition, in the sensory analysis performed, wines obtained with strains C22L9 and D13L3 were distinguished and earned good impression by the assessors, with the wine inoculated with strain C22L9 being the most preferred.

All the results presented above suggest that both strains could be used as starter cultures for MLF of Tempranillo wine in order to guarantee that this process proceeds successfully. However, in terms of the minor volatile composition and of sensory analysis results, the best characteristics were found in wine made with strain C22L9. It produces more ethyl lactate and an adequate quantity of 2,3-butanedione, both compounds greatly valued in wine, and therefore offers the best potential as a starter culture in malolactic fermentation. However, these results should be confirmed on an industrial-scale production the next vintage, to which Danstar Ferment A.G. will provide lyophilized culture.

Acknowledgements

The authors wish to thank Consejería de Educación y Ciencia of the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (JCCM) for the project PCC 05-003-2 and Ministerio de Educación y Ciencia (INIA) for the project RM 2006-00011-C02-02. P. Ruiz is supported by a grant of the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

References

- Aguilar, C.N., Gutierrez-Sanchez, G., 2001. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acylhydrolases. *Food Science and Technology International* 7, 373–382.
- Barbagallo, R.N., Spagna, G., Palmeri, R., Torriani, S., 2004. Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 34, 292–296.
- Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., 2004. The “buttery” attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology* 96, 235–252.
- Blom, H., 1983. Partial characterization of a thermostable anthocyanin- β -glycosidase from *Aspergillus niger*. *Food Chemistry* 12, 197–204.
- Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Carrau, F., Dellacassa, E., 2002. Effect of β -glycosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tannat wine during malolactic fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2344–2349.
- Bover-Cid, S., Holzapfel, W.H., 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 53, 33–41.
- Costantini, A., Cersosimo, M., Prete Del, V., García-Moruno, E., 2006. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: screening by PCR, thin-layer chromatography, and high performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must. *Journal of Food Protection* 69, 391–396.

- Coton, M., Coton, E., Lucas, P., Lonvaud-Funel, A., 2004. Identification of the gene encoding a putative decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiology* 21, 125–130.
- Coucheny, F., Desroche, N., Bou, M., Tourdot-Maréchal, R., Dulau, L., Guzzo, J., 2005. A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *International Journal of Food Microbiology* 105, 463–470.
- D'Incecco, N., Bartowsky, E., Kassara, S., Lante, A., Spetoli, P., Henschke, P., 2004. Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiology* 21, 257–265.
- Davis, C.R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T.H., Fleet, G.H., 1985. Practical implications of malolactic fermentation: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 36, 290–301.
- Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H., Jones, K.M., 1986. Data for Biochemical Research, 3rd edn. Clarendon Press, Oxford.
- de Revel, G., Martin, N., Pripis-Nicola, L., Lonvaud-Funel, A., Bertrand, A., 1999. Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 4003–4008.
- European Union, 1990. Commission Regulation Determining Community Methods for the Analysis of Wine. 2676/90. Brussels.
- Fayed, E.O., Sultan, N., Yassein, N.I., Shehata, A.E., 1986. The effect of lyophilization on viability and activity of LAB cultivated in whey treated with certain proteolytic enzymes. *Egyptian Journal of Food Science* 14, 313–322.
- Grimaldi, A., McLean, H., Jiranek, V., 2000. Identification and partial characterization of glycosidase activities of commercial strains of the lactic acid bacterium, *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 362–369.
- Grimaldi, A., Bartowsky, E., Jiranek, V., 2005a. A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology* 105, 233–244.
- Grimaldi, A., Bartowsky, E., Jiranek, V., 2005b. Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1061–1069.
- Guerrini, S., Mangani, S., Granchi, L., Vicenzini, M., 2002. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology* 44, 374–378.
- Henick-Kling, T., 1995. Method of malolactic fermentation in wine: energetics, flavour modification and methods for starter culture preparation. *Journal of Applied Bacteriology* 79, 29–39.
- Henick-Kling, T., Sandine, W.E., Heatherbell, D.A., 1989. Evaluation of malolactic bacteria isolated from Oregon wines. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 2010–2016.
- Huang, H.T., 1955. Decolorization of anthocyanins by fungal enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 3, 141–146.
- ISO Standard 4120, 1983. Sensory Analysis. Methodology Triangular Test.
- Izquierdo, P.M., García, E., Martínez, J., Chacón, J.L., 2005. Cepas comerciales de bacterias lácticas para la inducción de la fermentación maloláctica en vinos tintos Cencibel: Eficiencia, implantación e influencia sobre la calidad. *Alimentaria* 368, 94–100.
- Izquierdo, P.M., García, E., Gómez, S., Palop, M.L., 2008. Changes in the aromatic composition of Tempranillo wines during spontaneous malolactic fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 724–730.
- Izquierdo, P.M., Ruiz, P., Seseña, S., Palop, M.L., 2009. Ecological study of lactic acid microbiota isolated from Tempranillo wines of Castilla-La Mancha. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 108, 220–224.
- Izuagbe, Y.S., Dohman, T.P., Sandine, W.E., Heatherbell, D.A., 1985. Characterization of *Leuconostoc oenos* isolated from Oregon wines. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 680–684.
- Landete, J.M., Ferrer, S., Pardo, I., 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control* 18, 1569–1574.
- Laurent, M.H., Acree, T.E., Henick-Kling, T., 1994. Changes in aroma and odor of Chardonnay due to malolactic fermentation. *Weinwissenschaft* 49, 3–10.
- Le Jeune, C., Lonvaud-Funel, A., Ten Brink, B., Hofstra, H., Van der Vossen, J.M.B.M., 1995. Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test. *Journal of Applied Bacteriology* 78, 316–326.
- Lonvaud-Funel, A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 317–331.
- Lucas, P., Lonvaud-Funel, A., 2002. Purification and partial gene sequence of tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9808. *FEMS Microbiology Letters* 211, 85–89.
- Majjala, R., 1993. Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Letters in Applied Microbiology* 17, 40–43.
- Manzanares, P., Rojas, V., Genovés, S., Vallés, S., 2000. A preliminary search for anthocyanin- β -D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 35, 95–103.
- Marcobal, A., Rivas, B., Moreno-Arribas, V., Muñoz, R., 2004. Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiology Letters* 239, 213–220.
- Marcobal, A., Rivas, B., Moreno-Arribas, M.V., Muñoz, R., 2005. Multiplex PCR method for the simultaneous detection of histamine-, tyramine-, and putrescine-producing lactic acid bacteria in foods. *Journal of Food Protection* 68, 874–878.
- Martineau, B., Henick-Kling, T., 1995. Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. *Journal of Applied Bacteriology* 78, 526–536.
- McMahon, H., Zoecklein, B.W., Fugelsang, K., Jasinski, Y., 1999. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 198–203.
- Moreno-Arribas, V., Polo, M.C., Jorjanes, F., Muñoz, R., 2003. Screening of biogenic amines production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology* 84, 117–123.
- Nielsen, J.C., Pahl, C., Lonvaud-Funel, A., 1996. Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-dried *Leuconostoc oenos* cultures. *American Journal of Enology and Viticulture* 47, 42–48.
- Osawa, R., Walsh, T.P., 1993. Visual reading method for detection of bacterial tannase. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1251–1252.
- Reguant, C., Carreté, R., Ferrer, N., Bordons, A., 2005. Molecular analysis of *Oenococcus oeni* population dynamics and the effect of aeration and temperature during alcoholic fermentation on malolactic fermentation. *International Journal of Food Science & Technology* 40, 451–459.
- Rivas, B., Marcobal, A., Carrascosa, A., Muñoz, R., 2006. PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine and cadaverine. *Journal of Food Protection* 69, 336–341.
- Rodas, A.M., Ferrer, S., Pardo, I., 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology* 26, 412–422.
- Ruiz, P., Izquierdo, P.M., Seseña, S., Palop, M.L., 2008. Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiology* 25, 942–948.
- Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Wamer, P.J., Jiménez-Díaz, R., 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2059–2064.
- Seseña, S., Sánchez, I., Palop, M.L., 2005. Characterization of *Lactobacillus* strains and monitoring by RAPD-PCR in controlled fermentations of “Almagro” eggplants. *International Journal of Food Microbiology* 104, 325–335.
- Valdez, G.F., Giori, A.A., Holgado, R., 1985. Effect of the rehydration medium on the recovery of freeze-dried lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 1339–1341.
- Vaquero, I., Marcobal, A., Muñoz, R., 2004. Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology* 96, 199–204.
- Vauterin, L., Vauterin, P., 1992. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *European Microbiology* 1, 37–41.
- Vogel, R.F., Ehrmann, M.A., Gänzle, M.G., 2002. Development and potential of starter lactobacilli resulting from exploration of the sourdough ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 631–638.



**Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* isolates
from malolactic fermentation of Tempranillo wine**

Izquierdo, P.M., Gómez, S., **Ruiz, P.**, Seseña, S., García, E. y Palop, M.LI.

J. Food Protect. 72, 907-910

Research Note

Biogenic Amine Production by *Oenococcus oeni* Isolates from Malolactic Fermentation of Tempranillo Wine

P. M. IZQUIERDO CAÑAS,^{1*} S. GÓMEZ ALONSO,¹ P. RUIZ PÉREZ,² S. SESEÑA PRIETO,² E. GARCÍA ROMERO,¹
 AND M. LL. PALOP HERREROS²

¹Instituto de la Vid y del Vino de Castilla-La Mancha, Crta. Toledo-Albacete s/n 13700 Tomelloso (Ciudad Real), Spain; and

²Universidad de Castilla-La Mancha, Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Campus Tecnológico de la Fabrica de Armas, Avda. Carlos III s/n 45071 Toledo, Spain

MS 08-277: Received 13 June 2008/Accepted 1 November 2008

ABSTRACT

In this article, we examine the production of biogenic amines, histamine, putrescine, tyramine, and cadaverine by 90 strains of *Oenococcus oeni* isolated from different cellars of Castilla-La Mancha (Spain) during wine malolactic fermentation. Amino biogenic capacity of strains was qualitatively analyzed on agar. After that, production of amines on a synthetic medium and on wine, and presence in strains of histidine, ornithine, and tyrosine decarboxylase genes were determined. Only two strains were able to produce histamine or putrescine, both on synthetic medium and wine. The presence of the corresponding genes in these strains was also confirmed. These results suggest that *O. oeni* does not significantly contribute to the overall biogenic amine content of wines. The main contribution of this work is the isolation of a putrescine-producing *O. oeni* strain that harbors the ornithine gene, since this gene appears to be rarely present in the genome of *O. oeni*.

Biogenic amines are compounds formed by decarboxylation of amino acids, with participation of substrate-specific enzymes from diverse microorganisms (27), which can cause toxicological problems even if relatively low amounts are ingested.

In wine, it has been reported that the concentration of biogenic amines increases during malolactic fermentation (MLF) (23), and therefore, studies have been conducted on production of biogenic amines, especially histamine, by lactic acid bacteria (LAB) participating in MLF (8, 11). In these studies, the authors report that the aminobiogenic capacity of LAB strains used as starter cultures for MLF is an interesting property that should be tested prior to selection of the strains.

Several qualitative and quantitative methods to determine the production of biogenic amines have been described (2, 9, 17). The most common screening procedures involve the use of a differential medium containing a pH indicator such as bromocresol purple, although some authors have reported false-positive reactions when these media are used, due to the formation of alkaline compounds other than biogenic amines (22). Therefore, the use of complementary tests has been recommended, such as the detection of targeted genes by specific PCR. Conditions used in the detection of amino acid decarboxylase genes are reported elsewhere (4, 5, 13, 15, 18).

The aim of this study was to assess the occurrence of amino acid decarboxylase activities of 90 strains of *Oeno-*

coccus oeni isolated from samples of Tempranillo wine taken at different stages of MLF from nine cellars situated in the Castilla-La Mancha region (Spain), using qualitative and quantitative methods. In addition, in order to study the biogenic amine production in wine, strains were inoculated in wine once alcoholic fermentation had finished. The amine concentrations produced by *O. oeni* in wine were determined by liquid chromatography.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. A total of 90 *O. oeni* isolates were studied. They were representative of the main genotypes identified after random amplification of polymorphic DNA-PCR analysis, using primer M13 and conditions described by Ruiz et al. (26), of 446 isolates obtained from Tempranillo wine samples. Strains were grown on medium for *Leuconostoc oenos* (MLO; Scharlab, Barcelona, Spain) agar plates that were incubated at 28°C under anaerobic conditions (AnaeroGen, Atmosphere Generation System, Oxoid, Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK). They were propagated twice in MLO broth before using. A culture of *Lactobacillus* 30a known to produce histamine and putrescine was used as a positive control for the specific PCR reactions.

Determination of biogenic amine-forming capacity on plates. Amino acid decarboxylase activity of all 90 strains of *O. oeni* was assessed by using the decarboxylase medium described by Maijala (17). Two percent (wt/vol) of each precursor amino acid (L-histidine monohydrochloride, L-ornithine monohydrochloride, tyrosine disodium salt, and L-lysine monohydrochloride, all purchased from Sigma [St. Louis, MO]), and 0.005% (wt/vol) pyridoxal-5-phosphate (as a cofactor for the decarboxylation reaction) were added to the medium. Plates were incubated at 28°C,

* Author for correspondence. Tel: +34 926508060; Fax: +34 926512610; E-mail: pmizquierdo@jccm.es.

under anaerobic conditions for 7 days. Positive reactions were recorded by a change of the medium color to purple or by a disappearance of tyrosine precipitates around the colonies (2).

Production of biogenic amines in synthetic medium. Positive and weakly positive strains from qualitative analysis were grown on MLO broth until an optical density at 600 nm of 0.9 was reached, and then they were inoculated at 1% (vol/vol) into Maijala medium (17) containing L-histidine monohydrochloride, L-ornithine monohydrochloride, tyrosine disodium salt, or L-lysine monohydrochloride. After incubation at 28°C for 7 days under anaerobic conditions, 2 ml of broth was centrifuged ($13,000 \times g$ for 5 min), and the cell-free supernatant was collected and stored at -20°C until analysis. Samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC), according to the method described below.

Detection of the histidine decarboxylase, ornithine decarboxylase, and tyrosine decarboxylase genes. Genomic DNA from a single colony on MLO agar was extracted by following the procedure described by Rodas et al. (25). Presence of histidine decarboxylase (*hdc*), ornithine decarboxylase (*odc*), and tyrosine decarboxylase (*tdc*) genes was assayed by specific PCR reactions by following the procedure described by Marcobal et al. (19). Primer sets JV16HC and JV17HC (13), 3 to 16 (19), and P1-rev and P2-for (15) were used to detect *hdc*, *odc*, and *tdc* genes, respectively.

Production of biogenic amines in wine. A volume of 250 ml of Tempranillo wine was inoculated (1%, vol/vol) with each of the 90 strains. Flasks were aerobically incubated at 23°C, without shaking, until completion of MLF, as determined by the concentration of L-malic acid. After that, concentrations of amino acids (histidine, arginine, ornithine, tyrosine, and lysine) and biogenic amines (histamine, cadaverine, putrescine, and tyramine) were determined as described below. Each strain was assayed in duplicate. A sample of noninoculated wine was used as a blank.

The Tempranillo wine used had been fermented by using a commercial starter (UVAFERM VN Lallemand, Madrid, Spain) and after completion of the alcoholic fermentation, filtered through a 0.2- μ m-pore-size module (Millipore, Billerica, MA) to sterilize. Chemical composition of wine was determined as described below.

Before inoculation, strains were grown in MLO broth with 10% (vol/vol) tomato juice and anaerobically incubated at 28°C until a population of around 10^6 viable cells per milliliter was reached.

Chemical analysis of wine. The most common physico-chemical parameters in wine—alcoholic degree, pH, total acidity, volatile acidity, citric acid content, and SO₂ concentration—were determined by following the procedures described in the European Union *Commission Regulation Determining Community Methods for the Analysis of Wine* (6). Commercial enzymatic kits (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany) were used to determine L-malic and L-lactic acid contents.

Amino acid and biogenic amine determinations in wine by HPLC. Amino acid (histidine, arginine, ornithine, tyrosine, and lysine) and biogenic amine (histamine, cadaverine, putrescine, and tyramine) contents were determined by liquid chromatography by following the method proposed by Gómez-Alonso et al. (7). A Varian ProStar HPLC (Varian, Inc., Walnut Creek, CA) was used, equipped with a ProStar 240 pump, a ProStar 410 autosampler, and a ProStar 330 photodiode array detector. Separated compounds were identified based on the aminoanone-derivative reten-

tion times of the corresponding standard (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) and quantified by using the internal standard method.

RESULTS AND DISCUSSION

Positive results on agar plates containing the precursor amino acids were recorded for 27 of the 90 strains studied. Nevertheless, only the strains B10L9, B10L10, D23L15, D12L8, J34L5, and E20L6 grew abundantly on the plates containing L-histidine, and strain J20L8 did so on the plates containing ornithine, probably because of the higher levels of energy obtained from decarboxylation of amino acids (21). None of the assayed strains produced changes on tyrosine or lysine plates.

When cell-free supernatants of cultures in Maijala broth of the 27 strains were analyzed by HPLC, production of histamine and putrescine by strains J34L5 and J20L8, respectively, was confirmed (data not shown), while no amine production was detected for the remaining strains.

Specific PCR reactions also confirmed these results and, in line with reports by some authors (13, 19), the presence of a 367-bp band, corresponding to the *hdc* gene (13), and a 1,446-bp band, corresponding to the *odc* gene (19), was observed at strains J34L5 and J20L8, respectively. According to the PCR results, none of the remaining strains were positive.

Moreno-Arribas et al. (22) also reported false-positive results from biogenic amine analysis on agar plates, and Lonvaud-Funel and Joyeux (14) described that LAB can lose the ability to produce biogenic amines after prolonged storage or cultivation in synthetic media. More recently, Lucas et al. (16) demonstrated that the *hdc* gene is located on an unstable plasmid, and that the ability to produce histamine could be lost, depending on culture conditions.

Different results have been reported for biogenic amines production by *O. oeni*. For histamine, discrepancies have been found, and while some authors reported no histamine production in the assayed *O. oeni* cultures (3, 22), others found that the presence of *O. oeni* histamine-producing strains is not rare (5, 8, 11).

The results of putrescine for strain J20L8 are interesting in that until now, the only LAB reported to possess the *odc* gene were *O. oeni* BIFI-83, *Lactobacillus* 30a, and *Lactobacillus hilgardii* X1B (3, 11). This fact is especially surprising, considering that putrescine is the most prevalent amine in wines (10, 11). It suggests either that other organisms would be responsible for putrescine production during MLF, or that it is produced through alternative pathways that do not require the presence of the *odc* gene (1, 20).

As has already been emphasized by some authors (3, 11, 22), a low diffusion of tyramine-producing ability was observed within *O. oeni* strains assayed in this study. This activity seems to be more frequent in *Lactobacillus* spp.

In concordance with our results for lysine, no references reporting the existence of cadaverine-producing LAB strains, including *O. oeni*, have been found. Lysine decarboxylase activity has been reported to be frequent in *Enterobacteriaceae* spp. (24).

TABLE 1. Effect of LAB strain on wine biogenic amines content after MLF

| Strain | Histamine (mg/liter) | | Putrescine (mg/liter) | | Tyramine (mg/liter) | | Cadaverine (mg/liter) | |
|--------|----------------------|------|-----------------------|------|---------------------|------|-----------------------|------|
| | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD |
| Blank | 0.23 | 0.10 | 4.94 | 0.52 | 0.70 | 0.07 | 0.36 | 0.04 |
| A13L2 | 0.42 | 0.01 | 5.39 | 0.01 | 1.12 | 0.04 | 0.39 | 0.02 |
| B21L6 | 0.27 | 0.01 | 4.67 | 0.18 | 0.73 | 0.04 | 0.33 | 0.00 |
| B12L4 | 0.32 | 0.03 | 5.16 | 0.37 | 0.82 | 0.10 | 0.37 | 0.03 |
| B13L4 | 0.29 | 0.01 | 5.08 | 0.17 | 0.88 | 0.04 | 0.36 | 0.01 |
| B23L11 | 0.27 | 0.01 | 5.06 | 0.04 | 0.89 | 0.00 | 0.35 | 0.00 |
| B23L9 | 0.17 | 0.03 | 5.26 | 0.01 | 0.84 | 0.05 | 0.40 | 0.00 |
| C21L3 | 0.28 | 0.06 | 5.42 | 0.00 | 0.85 | 0.04 | 0.39 | 0.00 |
| C22L9 | 0.38 | 0.02 | 5.38 | 0.03 | 0.86 | 0.05 | 0.39 | 0.01 |
| C13L12 | 0.37 | 0.01 | 5.41 | 0.06 | 0.87 | 0.02 | 0.39 | 0.01 |
| C12L5 | 0.43 | 0.01 | 5.45 | 0.04 | 0.94 | 0.08 | 0.40 | 0.01 |
| D23L15 | 0.43 | 0.05 | 5.37 | 0.09 | 1.06 | 0.02 | 0.39 | 0.00 |
| D23L6 | 0.40 | 0.00 | 5.30 | 0.02 | 0.80 | 0.04 | 0.38 | 0.00 |
| D21L8 | 0.26 | 0.00 | 4.95 | 0.77 | 0.71 | 0.11 | 0.37 | 0.07 |
| D13L13 | 0.39 | 0.01 | 5.36 | 0.00 | 0.91 | 0.09 | 0.39 | 0.02 |
| E20L2 | 0.26 | 0.22 | 5.11 | 0.35 | 0.78 | 0.07 | 0.39 | 0.03 |
| E11L7 | 0.17 | 0.06 | 4.04 | 0.83 | 0.62 | 0.16 | 0.31 | 0.07 |
| F14L10 | 0.46 | 0.03 | 5.44 | 0.08 | 0.86 | 0.05 | 0.40 | 0.01 |
| F10L4 | 0.12 | 0.06 | 3.99 | 1.64 | 0.59 | 0.26 | 0.30 | 0.13 |
| G13L4 | 0.11 | 0.00 | 3.42 | 0.24 | 0.48 | 0.08 | 0.30 | 0.03 |
| G13L3 | 0.29 | 0.04 | 5.39 | 0.02 | 0.95 | 0.09 | 0.41 | 0.01 |
| G23L5 | 0.14 | 0.05 | 3.82 | 1.22 | 0.65 | 0.24 | 0.28 | 0.10 |
| I24L7 | 0.39 | 0.01 | 5.44 | 0.05 | 0.81 | 0.03 | 0.39 | 0.01 |
| I21L1 | 0.14 | 0.10 | 3.31 | 2.39 | 0.52 | 0.37 | 0.24 | 0.17 |
| J24L7 | 0.34 | 0.10 | 5.36 | 0.11 | 0.80 | 0.11 | 0.38 | 0.02 |
| J20L8 | 0.19 | 0.08 | 12.62 | 1.78 | 0.70 | 0.14 | 0.63 | 0.11 |
| J34L5 | 9.24 | 0.91 | 4.50 | 0.26 | 0.73 | 0.09 | 0.33 | 0.02 |
| J31L5 | 0.41 | 0.00 | 5.40 | 0.03 | 0.80 | 0.04 | 0.38 | 0.01 |

Chemical analysis of the Tempranillo wine used to assay production of amines in wine reported the usual values for these wines: 13.45% (vol/vol) alcohol content, 2.37 g/liter malic acid, 0.34 g/liter citric acid, 45 mg/liter total SO₂, 0.31 g/liter volatile acidity, 5.27 g/liter total acidity, and pH 3.59. Concentrations of amino acids in noninoculated wine, as determined by HPLC, were 14.62 mg/liter histidine, 43.49 mg/liter arginine, 17.03 mg/liter ornithine, 9.67 mg/liter tyrosine, and 25.05 mg/liter lysine.

Biogenic amine concentrations in wines inoculated with each of the 27 strains are shown at Table 1. Production of histamine and putrescine by strains J34L5 and J20L8, respectively, was again confirmed, and it is important to highlight that the amount of histamine produced was higher than the upper limits recommended in some countries. The quantity of amines formed by the remaining strains was

negligible, with concentrations of cadaverine ≤0.40 mg/liter for all except strain J20L8, and concentrations of tyramine ranging between 0.5 and 1.1 mg/liter. Landete et al. (12) reported similar results, finding cadaverine concentrations in wine less than 0.5 mg/liter.

A correlation between biogenic amine and corresponding precursor amino acid concentrations was observed in wines inoculated with strains J34L5 and J20L8 (Table 2). In addition, for strain J20L8, a slight decrease in the arginine concentration occurred, which could have contributed to the formation of both ornithine, via the arginine deaminase pathway, and putrescine.

Like Landete et al. (11, 12), we found a good correlation between results for biogenic amine production in MLO broth and wine and presence of *hdc*, *odc*, and *tdc* genes.

Given the small number of strains of *O. oeni* that were able to produce biogenic amines, it is possible to state that *O. oeni* does not significantly contribute to the overall biogenic amine content of wines. In addition, the ability to produce the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine seems to be not a consistent characteristic of this species, but rather a strain-dependent property limited to a small number of strains.

The most relevant contribution of this work is the isolation of a putrescine-producing *O. oeni* strain, which har-

TABLE 2. Effect of different LAB strains on wine biogenic amines and their precursor amino acids content

| Amino acid | Blank | J20L8 | J34L5 |
|------------|-------|-------|-------|
| Histidine | 14.62 | 13.55 | 2.15 |
| Arginine | 43.49 | 38.68 | 42.59 |
| Histamine | 0.15 | 0.19 | 9.24 |
| Ornithine | 17.03 | 1.33 | 16.26 |
| Putrescine | 5.31 | 12.62 | 4.50 |

bors the *odc* gene since, as reported by numerous authors, the presence of the *odc* gene appears to be rarely present in the genome of *O. oeni*. Further research is being carried out to sequence this gene.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Consejería de Educación y Ciencia of the Castilla-La Mancha Community for project PCC 05-003-2, and the Ministerio de Educación y Ciencia for project RM 2006-00011-C02-02.

REFERENCES

- Arena, M. E., and M. C. Manca de Nadra. 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *J. Appl. Microbiol.* 90:158–162.
- Bover-Cid, S., and W. H. Holzapfel. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 53:33–41.
- Costantini, A., M. Cersosimo, V. Del Prete, and E. García-Moruno. 2006. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: screening by PCR, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must. *J. Food Prot.* 69:391–396.
- Coton, E., G. Rollan, A. Bertrand, and A. Lonvaud-Funel. 1998. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency, and distribution. *Am. J. Enol. Vitic.* 49:199–204.
- Coton, M., E. Coton, P. Lucas, and A. Lonvaud-Funel. 2004. Identification of the gene encoding a putative decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiol.* 21:125–130.
- European Union. 1990. Commission Regulation determining Community methods for the analysis of wine, 2676/90. European Union, Brussels.
- Gómez-Alonso, S., I. Hermosín, and E. García-Romero. 2007. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ion as aminoenones derivatives in wine and beer samples. *J. Agric. Food Chem.* 55:608–613.
- Guerrini, S., S. Mangani, L. Granchi, and M. Vicenzini. 2002. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Curr. Microbiol.* 44:374–378.
- Hernández-Jover, T., M. Izquierdo-Pulido, M. T. Veciana-Nogués, and M. C. Vidal-Carou. 1996. Ion pair high performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products. *J. Agric. Food Chem.* 44:2710–2715.
- Izquierdo Cañas, P. M., E. García Romero, S. Gómez Alonso, and M. L. L. Palop Herreros. 2008. Amino acids and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentation in Tempranillo red wines. *J. Food Compos. Anal.* 21:731–735.
- Landete, J. M., S. Ferrer, and I. Pardo. 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control* 18:1569–1574.
- Landete, J. M., S. Ferrer, L. Polo, and I. Pardo. 2005. Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *J. Agric. Food Chem.* 53:1119–1124.
- Le Jeune, C., A. Lonvaud-Funel, B. ten Brink, H. Holstra, and J. M. B. M. van der Vossen. 1995. Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test. *J. Appl. Bacteriol.* 78:316–326.
- Lonvaud-Funel, A., and A. Joyeux. 1994. Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* 77:401–407.
- Lucas, P., and A. Lonvaud-Funel. 2002. Purification and partial gene sequence of the tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. *FEMS Microbiol. Lett.* 211:85–89.
- Lucas, P., W. A. Wolken, O. Claisse, J. S. Lolkema, and A. Lonvaud-Funel. 2005. Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1417–1424.
- Maijala, R. 1993. Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS broth and modified decarboxylation agar. *Lett. Appl. Microbiol.* 17:40–43.
- Marcobal, A., B. Rivas, M. V. Moreno-Arribas, and R. Muñoz. 2004. Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiol. Lett.* 27:423–426.
- Marcobal, A., B. Rivas, M. V. Moreno-Arribas, and R. Muñoz. 2005. Multiplex PCR method for the simultaneous detection of histamine-, tyramine-, and putrescine-producing lactic acid bacteria in foods. *J. Food Prot.* 68:874–878.
- Mira de Orduña, R., S. Q. Liu, M. L. Patchett, and G. J. Pilone. 2000. Kinetics of the arginine metabolism of malolactic wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* CUC-3 and *Oenococcus oeni* Lo111. *J. Appl. Microbiol.* 89:547–552.
- Molenaar, D., J. S. Bosscher, B. ten Brink, M. J. Driessen, and W. N. Konnings. 1993. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *J. Bacteriol.* 175:2864–2870.
- Moreno-Arribas, V., M. C. Polo, F. Jorganes, and R. Muñoz. 2003. Screening of biogenic amines production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Int. J. Food Microbiol.* 84:117–123.
- Ribereau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Donèche, and A. Lonvaud. 2000. Handbook of enology, vol. 1. John Wiley and Sons, New York.
- Rivas, B., A. Marcobal, A. Carrascosa, and R. Muñoz. 2006. PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. *J. Food Prot.* 69:336–341.
- Rodas, A. M., S. Ferrer, and I. Pardo. 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst. Appl. Microbiol.* 26:412–422.
- Ruiz, P., P. A. Izquierdo, S. Seseña, and M. L. L. Palop. 2008. Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiol.* 25:942–948.
- ten Brink, B., C. Damink, H. M. L. J. Joosten, and J. H. H. Huis in't Veld. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 11:73–84.

**Colonizing ability of a selected autochthonous strain of
*Oenococcus oeni***

Ruiz, P., Izquierdo, P.M., Seseña, S. y Palop, M.LI.

(En preparación)

Colonizing ability of a selected autochthonous strain of *Oenococcus oeni*

Patricia Ruiz^a, Pedro Miguel Izquierdo^b, Susana Seseña^a, María Llanos Palop^{a,*}

^a *Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Universidad de Castilla-La Mancha, Avda. Carlos III s/n, 45071, Toledo, Spain*

^b *Instituto de la Vid y del Vino de Castilla-La Mancha, Crta. Toledo-Albacete s/n, 13700, Tomelloso (Ciudad Real), Spain*

* Corresponding author. Tel.: +34-925-265-716; fax: +34-925-268-840.

E-mail address: MariaLlanos.Palop@uclm.es (M.Ll. Palop)

Abstract

The goal of this research is to study the colonizing ability, calculated as implantation values (%), in wines from different grapes varieties (Tempranillo, Syrah, Cabernet Sauvignon and Tinto Pámpana Blanca), of an autochthonous previously selected *Oenococcus oeni* strain (C22L9), in order to assess its potential as oenological starter culture. Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) was used to determine implantation values. Results obtained were compared with those of a commercial strain (*O. oeni* PN4) (Danstar Ferment A.G.). *O. oeni* C22L9 showed higher implantation values in Tempranillo, Syrah and Tinto Pámpana Blanca wines, while it was lower in Cabernet Sauvignon wine. It is important to highlight the successful implantation searched in Syrah and Tinto Pámpana Blanca wines, in spite of the high alcohol content and the low pH of these wines. From results of these assays it is possible to affirm that *O. oeni* C22L9 could be a suitable starter culture for malolactic fermentation (MLF) in these wine varieties. Use of this autochthonous strain will allow MLF will proceed successfully at the same time that the organoleptic characteristics of wines made in Castilla-La Mancha are maintained, which has frequently been demanded by cellars in this region.

Keywords: Tempranillo, Syrah, Cabernet Sauvignon, Tinto Pámpana Blanca, Malolactic fermentation, RAPD-PCR

1. Introduction

Malolactic fermentation (MLF) in wine is a process carried out by lactic acid bacteria (LAB), in which malic acid is decarboxylated to lactic acid and carbon dioxide (Wibowo et al. 1985), resulting in a de-acidification and a greater microbiological stability of the wine. In addition, many other reactions changing the organoleptic properties of wines occur, that make MLF beneficial (Lonvaud-Funel 1999).

Previous reports have shown the presence of different species and strains of lactic acid bacteria in spontaneous MLF, although *O. oeni* has been described as the predominant species (Guerrini et al. 2003, Rodas et al. 2003, Larisika et al. 2008). Malolactic fermentation is usually performed by the autochthonous microbiota existing in grapes and cellars, but sometimes the process may occur over weeks without always achieving satisfactory results (Maicas 2001, Agouridis et al. 2005). To induce and to carry out a better control of MLF, inoculation of commercial malolactic starter cultures is becoming a common oenological practice in wineries. However, it is not always successful, because wine is a very harsh environment (Coucheney et al. 2005) and growth of inoculated bacteria and time required to complete MLF is influenced by diverse factors in wine (i.e. chemical composition, presence of energy sources, existence of other microbiota, etc.) (Ribéreau-Gayon et al. 2000) being resistance to wine conditions a strain-dependent property (Britz and Tracey 1990, Le Jeune and Lonvaud-Funel 1997).

The use of an autochthonous starter culture well-adapted to the conditions of a specific wine-producing area seems to improve this situation and some reports (Beelman et al. 1980, Wibowo et al. 1985, Henick-Kling et al. 1989, Reguant et al. 2005) have demonstrated that autochthonous strains are superior inducers of MLF and therefore their use has been recommended (Izuagbe et al. 1985, Nielsen et al. 1996). Selection of strains to be used as wine starters is essentially based on their survival in wine, the consumption of L-malic acid and the presence of other useful oenological properties, such as the incapacity to produce biogenic amines or the presence of diverse enzymatic activities (Henick-Kling et al. 1989, Zapparoli et al. 2000, Coucheney et al. 2005). However, an appropriate method to select starter cultures should involve the inoculation of LAB in wines of different grape varieties (Nielsen et al. 1996) to know the colonizing ability of the strains and their influence in the chemical characteristics of wines.

In this study, the ability of an autochthonous *Oenococcus oeni* strain (C22L9), previously selected at our laboratory (Ruiz et al. in press) and of a commercial strain (*O. oeni* PN4) (Danstar Ferment A.G.) to colonize wines elaborated from four of the most abundant grape varieties in the Castilla-La Mancha region of Spain, has been assayed. In addition, chemical and sensorial analysis of wines from both strains, have been performed.

2. Materials and methods

2.1. Microbial growth through controlled fermentations: study of the colonizing ability of the inoculated strains

Flasks containing 10 L of wine were inoculated (1% v/v) with a culture in MLO broth of the autochthonous previously selected strain, *O. oeni* C22L9 (Ruiz et al. in press) or the commercial strain *O. oeni* PN4, to reach an initial population of 10^6 cfu/mL. Flasks were incubated at 22 °C until consumption of malic acid. Fermentations were carried out in duplicate (V1 and V2) and for each wine variety a non-inoculated flask was assayed to carry out a spontaneous MLF.

Wine varieties used in this study were Tempranillo, Syrah, Cabernet Sauvignon and Tinto Pámpana Blanca obtained from wineries of Castilla-La Mancha in the vintage of 2009.

Samples of wine were taken under aseptic conditions, immediately after inoculation (stage 0) and at the middle and the end of MLF (stages 1 and 2, respectively). Samples were serially diluted into sterile physiological saline (0.9% w/v NaCl) solution and spread onto MLOA plates supplemented with sodium azide (50 mg/mL) and cycloheximide (100 mg/mL) to suppress growth of acetic acid bacteria and yeast, respectively. Plates were anaerobically incubated for 5 days at 30°C and after counting, ten isolated colonies were picked at random and purified by successive streaking onto the same medium. Pure cultures were typed by RAPD-PCR as described below. Patterns were compared with that of the inoculated strain and the implantation rate was calculated as the number of colonies with the specific RAPD-PCR pattern divided by the total number of colonies picked, and expressed as a percentage (Ruiz-Barba et al. 1994).

2.2. Typing of isolates by RAPD-PCR analysis

DNA extraction was carried out as described by Rodas et al. (2003). A colony was suspended in 10 μ L steril milli-Q water and 1 μ L of the suspension used for PCR reactions.

RAPD-PCR reactions were performed in a total volume of 20 μ L according to the procedure described by Ruiz et al. (2008). The primer M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') purchased from Bonsai Technologies Group (Madrid, Spain) was used. Amplification was carried out using a 2400 Perkin Elmer thermal cycler (Perkin Elmer Co., USA). To determine the minimum percentage of similarity (r) necessary for strain discrimination, a reproducibility study was carried out on eight isolates as described by Ruiz et al. (2008).

RAPD-PCR gels were visualized by UV trans-illumination at 254 nm and photographed with a KODAK DC290 Zoom Digital Camera. The patterns were normalized and further processed using the GelCompar version 4.0 pattern analysis software package, (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) (Vauterin and Vauterin 1992). Isolates were grouped using the Dice coefficient and single linkage cluster analysis.

2.3. Chemical analysis of wines

A control wine without MLF and those from one of the fermentations carried out for each wine variety were analyzed after the conclusion of MLF. The most common chemical parameters in the wine were assayed namely alcohol content, glucose+fructose content, total acidity measured as tartaric acid content, pH, volatile acidity measured as acetic acid content, L -malic acid, L -lactic acid and citric acid content, and colour intensity. Procedures described in the European Union's Official Methods of wine analysis (European Union 1990) were followed.

Wines were further analyzed for the most important minor volatile compounds (acetaldehyde, ethyl lactate, methanol, 2,3-butanodione, isobutanol, isoamyl acetate, isoamyl, 3-OH-2-butanone, ethyl acetate), as described by Izquierdo et al. (2008).

Content of some biogenic amine (histamine, tyramine, putrescine and cadaverine) was determined using the method described by Gómez-Alonso et al. (2007). A Varian ProStar HPLC (Varian Inc., Walnut Creek, California, USA) equipped with a ProStar 240 pump, a ProStar 410 autosampler and a ProStar 330 photodiode array detector, was used.

All analyses were performed in duplicate.

2.4. Sensory analysis

A preliminary sensory analysis using a triangular test (ISO Standard 4120, 1983) was performed to know if differences between wines elaborated from the commercial strain and those from the selected strain were appreciated. Three samples for each set were presented simultaneously, of which two of them were identical. Each wine sample was analyzed by 12 assessors, 60% women and 40% men, during three different sessions. Each assessor was asked to identify the different sample and to select the preferred one. The sample sets were randomly distributed among the assessors. A significance level of 5% was chosen.

2.5. Statistical analysis

The paired Student t-test was used to determine if significant differences between the results from chemical analysis exist. The SPSS 12.0 program was used to calculate means and standard deviations of the results.

3. Results

Table 1 shows results from counts on MLOA plates and MLF duration. Counts immediately after inoculation (stage 0) ranged between 1.46×10^5 and 5.70×10^6 cfu/mL, increasing to 3.60×10^6 - 4.50×10^7 cfu/mL at the end of MLF (stage 2). Important differences in MLF duration were observed both between wines and strains, with values ranging between 9 and 41 days. For all wine varieties, duration of spontaneous MLF was the longest and that from wines inoculated with *O. oeni* PN4, with the exception of V1 fermentation in Syrah wine, was the shortest, although counts reached after inoculation (stage 0) were similar for both strains.

Table 2 shows the mean values and the standard deviation for the chemical parameters and the biogenic amines analyzed in control wines and those from both strains. It is important to note the low pH and the high alcohol content in Syrah, Cabernet Sauvignon and Tinto Pámpana Blanca wines. When considering the mean values for all samples, during MLF it was observed a decrease in the total acidity of around 1 g/L and a subsequent increase in pH of approximately 0.2 units. An average increase of 0.08 g/L in volatile acidity, the almost total transformation of malic acid into lactic acid, and the decrease of citric acid, were also noted.

Table 1

Counts (cfu/mL), MLF duration and implantation values (%) of the inoculated obtained at each stage at both fermentations in each of the wines.

| Wine | Strain | Assay | MLF duration (days) | | Stage | | |
|----------------------|--------|-------------|---------------------------|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | | | 0 | 1 | 2 |
| Tempranillo | C22L9 | Spontaneous | 16 | Count* | 9.10×10^3 | 1.38×10^5 | 1.80×10^6 |
| | | | 13 | Count | 5.70×10^6 | 1.60×10^7 | 3.70×10^7 |
| | | V1 | 11 | Implantation | 100 | 100 | 100 |
| | | | | Count | 2.16×10^6 | 8.15×10^6 | 1.03×10^7 |
| | | V2 | 11 | Implantation | 90 | 100 | 100 |
| | | | | Count | 2.16×10^6 | 8.15×10^6 | 1.03×10^7 |
| | PN4 | V1 | 9 | Count | 7.80×10^5 | 1.78×10^6 | 8.40×10^6 |
| | | | 9 | Implantation | 90 | 100 | 80 |
| | | V2 | 10 | Count | 2.12×10^5 | 1.35×10^6 | 4.21×10^6 |
| | | | | Implantation | 100 | 90 | 90 |
| | | V2 | 10 | Count | 2.12×10^5 | 1.35×10^6 | 4.21×10^6 |
| | | | | Implantation | 100 | 90 | 90 |
| Syrah | C22L9 | Spontaneous | 16 | Count | 4.10×10^3 | 2.28×10^7 | 4.20×10^7 |
| | | | 14 | Count | 2.80×10^5 | 7.70×10^6 | 1.33×10^7 |
| | | V1 | 14 | Implantation | 90 | 100 | 100 |
| | | | | Count | 1.70×10^6 | 1.98×10^7 | 4.50×10^7 |
| | | V2 | 12 | Implantation | 100 | 90 | 100 |
| | | | | Count | 1.70×10^6 | 1.98×10^7 | 4.50×10^7 |
| | PN4 | V1 | 16 | Count | 3.90×10^5 | 2.60×10^6 | 1.01×10^7 |
| | | | 16 | Implantation | 100 | 100 | 100 |
| | | V2 | 10 | Count | 1.61×10^6 | 2.65×10^7 | 3.30×10^7 |
| | | | | Implantation | 90 | 90 | 70 |
| | | V2 | 10 | Count | 1.61×10^6 | 2.65×10^7 | 3.30×10^7 |
| | | | | Implantation | 90 | 90 | 70 |
| Cabernet Sauvignon | C22L9 | Spontaneous | 41 | Count | 4.10×10^2 | 4.00×10^4 | 1.06×10^6 |
| | | | 35 | Count | 1.46×10^5 | 1.23×10^7 | 2.06×10^7 |
| | | V1 | 35 | Implantation | 100 | 70 | 70 |
| | | | | Count | 1.76×10^5 | 2.05×10^6 | 3.60×10^6 |
| | | V2 | 38 | Implantation | 100 | 90 | 60 |
| | | | | Count | 1.76×10^5 | 2.05×10^6 | 3.60×10^6 |
| | PN4 | V1 | 21 | Count | 2.70×10^6 | 6.50×10^6 | 1.50×10^7 |
| | | | 21 | Implantation | 100 | 90 | 100 |
| | | V2 | 23 | Count | 3.60×10^5 | 1.28×10^6 | 7.20×10^6 |
| | | | | Implantation | 100 | 100 | 100 |
| | | V2 | 23 | Count | 3.60×10^5 | 1.28×10^6 | 7.20×10^6 |
| | | | | Implantation | 100 | 100 | 100 |
| Tinto Pámpana Blanca | C22L9 | Spontaneous | 24 | Count | 1.54×10^2 | 1.30×10^5 | 7.00×10^6 |
| | | | 21 | Count | 9.90×10^5 | 6.50×10^6 | 1.24×10^7 |
| | | V1 | 21 | Implantation | 100 | 100 | 100 |
| | | | | Count | 4.30×10^5 | 2.05×10^6 | 1.12×10^7 |
| | | V2 | 19 | Implantation | 90 | 90 | 100 |
| | | | | Count | 4.30×10^5 | 2.05×10^6 | 1.12×10^7 |
| | PN4 | V1 | 17 | Count | 1.10×10^6 | 5.80×10^6 | 1.85×10^7 |
| | | | 17 | Implantation | 20 | 60 | 50 |
| | | V2 | 12 | Count | 1.20×10^6 | 1.02×10^7 | 1.59×10^7 |
| | | | | Implantation | 100 | 80 | 100 |
| | | V2 | 12 | Count | 1.20×10^6 | 1.02×10^7 | 1.59×10^7 |
| | | | | Implantation | 100 | 80 | 100 |

(*) Data are the mean values

Table 2

Mean values and standard deviation of the chemical parameters and the biogenic amines analyzed in control wines and those fermented with C22L9 and PN4 *O. oeni* strains.

| | Tempranillo | | | | | | Syrah | | | | | |
|----------------------------|-------------|------|-------|------|-------|------|---------|------|-------|------|-------|------|
| | Control | | C22L9 | | PN4 | | Control | | C22L9 | | PN4 | |
| | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD |
| Chemical parameters | | | | | | | | | | | | |
| Alcohol content (% v/v) | 12.05 | 0.04 | 11.86 | 0.01 | 11.87 | 0.01 | 13.31 | 0.04 | 12.84 | 0.06 | 12.96 | 0.04 |
| G+F (g/L) | 0.03 | 0.01 | 0.09 | 0.07 | 0.11 | 0.02 | 0.03 | 0.01 | 0.07 | 0.06 | 0.04 | 0.01 |
| Total acidity (g/L) | 5.34 | 0.12 | 4.32 | 0.02 | 4.30 | 0.01 | 6.59 | 0.09 | 5.05 | 0.06 | 5.61 | 0.21 |
| pH | 3.57 | 0.05 | 3.65 | 0.00 | 3.77 | 0.06 | 3.26 | 0.02 | 3.48 | 0.03 | 3.61 | 0.03 |
| Volatile acidity (g/L) | 0.14 | 0.02 | 0.19 | 0.01 | 0.28 | 0.04 | 0.18 | 0.02 | 0.26 | 0.01 | 0.29 | 0.01 |
| L-malic acid (g/L) | 2.92 | 0.06 | 0.11 | 0.02 | 0.11 | 0.02 | 3.38 | 0.08 | 0.09 | 0.01 | 0.27 | 0.06 |
| L-lactic acid (g/L) | 0.03 | 0.01 | 1.86 | 0.03 | 1.76 | 0.03 | 0.07 | 0.01 | 1.65 | 0.01 | 1.75 | 0.06 |
| Citric acid (g/L) | 0.26 | 0.01 | 0.21 | 0.02 | 0.05 | 0.01 | 0.34 | 0.02 | 0.28 | 0.01 | 0.13 | 0.04 |
| Color intensity | 7.76 | 0.03 | 6.43 | 0.09 | 6.48 | 0.13 | 12.74 | 0.22 | 12.12 | 0.44 | 10.11 | 0.32 |
| Biogenic amines | | | | | | | | | | | | |
| Histamine (mg/L) | 0.01 | 0.00 | 0.33 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.08 | 0.04 | 0.08 | 0.06 | 0.09 | 0.05 |
| Tyramine (mg/L) | 2.07 | 0.14 | 0.18 | 0.08 | 1.52 | 1.48 | 1.12 | 0.62 | 1.03 | 0.64 | 0.98 | 0.65 |
| Putrescine (mg/L) | 3.40 | 0.08 | 3.56 | 0.11 | 3.47 | 0.06 | 9.41 | 0.09 | 9.60 | 0.08 | 9.58 | 0.11 |
| Cadaverine (mg/L) | 0.58 | 0.02 | 0.61 | 0.02 | 0.59 | 0.01 | 0.05 | 0.01 | 0.05 | 0.01 | 0.04 | 0.00 |

| | Cabernet Sauvignon | | | | | | Tinto Pámpa Blanca | | | | | |
|----------------------------|--------------------|------|-------|------|-------|------|--------------------|------|-------|------|-------|------|
| | Control | | C22L9 | | PN4 | | Control | | C22L9 | | PN4 | |
| | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD |
| Chemical parameters | | | | | | | | | | | | |
| Alcohol content (% v/v) | 13.10 | 0.02 | 12.89 | 0.00 | 12.97 | 0.04 | 14.61 | 0.01 | 14.47 | 0.00 | 14.46 | 0.01 |
| G+F (g/L) | 0.06 | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.08 | 0.01 | 0.08 | 0.01 | 0.00 | 0.03 |
| Total acidity (g/L) | 6.26 | 0.16 | 5.52 | 0.33 | 5.78 | 0.22 | 5.74 | 0.21 | 4.82 | 0.09 | 4.54 | 0.33 |
| pH | 3.19 | 0.01 | 3.47 | 0.05 | 3.23 | 0.02 | 3.24 | 0.02 | 3.41 | 0.00 | 3.42 | 0.05 |
| Volatile acidity (g/L) | 0.20 | 0.01 | 0.26 | 0.02 | 0.26 | 0.01 | 0.26 | 0.02 | 0.29 | 0.02 | 0.34 | 0.01 |
| L-malic acid (g/L) | 1.96 | 0.03 | 0.11 | 0.05 | 0.09 | 0.04 | 2.51 | 0.06 | 0.09 | 0.01 | 0.09 | 0.06 |
| L-lactic acid (g/L) | 0.04 | 0.00 | 1.55 | 0.04 | 1.09 | 0.01 | 0.08 | 0.01 | 1.67 | 0.03 | 1.62 | 0.03 |
| Citric acid (g/L) | 0.28 | 0.02 | 0.20 | 0.03 | 0.21 | 0.01 | 0.26 | 0.00 | 0.23 | 0.00 | 0.03 | 0.01 |
| Color intensity | 12.18 | 0.31 | 11.43 | 0.71 | 11.10 | 0.15 | 10.75 | 0.09 | 9.89 | 0.00 | 9.50 | 0.13 |
| Biogenic amines | | | | | | | | | | | | |
| Histamine (mg/L) | 0.11 | 0.01 | 0.13 | 0.02 | 0.16 | 0.08 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Tyramine (mg/L) | 1.80 | 0.28 | 1.06 | 0.31 | 1.62 | 0.22 | 2.68 | 0.98 | 1.12 | 0.90 | 0.59 | 0.65 |
| Putrescine (mg/L) | 11.36 | 0.25 | 11.61 | 0.11 | 11.72 | 0.59 | 9.25 | 0.04 | 9.04 | 0.01 | 8.96 | 0.09 |
| Cadaverine (mg/L) | 0.81 | 0.02 | 0.84 | 0.01 | 0.84 | 0.04 | 0.20 | 0.01 | 0.21 | 0.01 | 0.21 | 0.00 |

Putrescine was the most abundant amine at all wine varieties both before and after FML. Important differences were obtained for putrescine concentration between varieties, though it increased in all cases during winemaking except in Tinto Pámpana Blanca wine. Tyramine was the second most abundant amine in the wines analyzed and it presented a decrease in content during MLF. Histamine and cadaverine showed very low contents both before and after MLF, though a slight increase in histamine concentration was observed in Tempranillo wine inoculated with *O. oeni* C22L9.

Gas chromatography results of minor volatile compounds are shown in Table 3. As compared with control wines, those inoculated with both strains showed a decrease in acetaldehyde and isoamyl acetate concentrations and an increase in 2,3-butanedione, 3-OH-2-butanone and ethyl lactate concentrations, although differences among strains were observed. Concentrations of the remaining analyzed compounds increased or decreased depending on both the strains and the wine variety.

Six hundred isolates from countable MLOA plates were obtained and analyzed by RAPD-PCR. A dendrogram for each inoculated strain was constructed from cluster analysis of the patterns of the isolates and that of the inoculated strain (data not shown). The value for the similarity coefficient ($r = 82\%$) obtained from the reproducibility study was applied to calculate the implantation values (%) corresponding to each stage at both fermentations (V1 and V2) in each of the wines. These values are showed in Table 1. *O. oeni* C22L9 showed implantation values ranged between 90% and 100% in the different stages in Tempranillo, Syrah and Tinto Pámpana Blanca wines. In Cabernet Sauvignon wine a different behaviour was observed and although a 100% implantation was obtained immediately after inoculation (stage 0), it decreased to values between 60% and 70% at the end of MLF (stage 2). *O. oeni* PN4 showed a slightly lower colonizing ability in Tempranillo and Syrah wines with values at the end of MLF ranging between 70% and 100%. On the contrary, it showed a 100% implantation at both fermentations in Cabernet Sauvignon wine. Results obtained in duplicated fermentations at Tinto Pampana Blanca wine were very different and while a value of 100% was obtained for V2 fermentation only a 50% was reached for V1 fermentation.

Table 3

Mean values and standard deviation of the minor volatile compounds analyzed in control wines and those fermented with C22L9 and PN4 *O. oeni* strains.

| | Tempranillo | | | | | | Syrah | | | | | |
|---------------------------------|-------------|------|--------|------|--------|------|---------|------|--------|------|--------|------|
| | Control | | C22L9 | | PN4 | | Control | | C22L9 | | PN4 | |
| | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD |
| Minor volatile compounds | | | | | | | | | | | | |
| Acetaldehyde (mg/L) | 12.81 | 0.46 | 2.56 | 0.39 | 3.38 | 0.28 | 15.77 | 0.48 | 2.67 | 0.24 | 8.09 | 1.83 |
| Ethyl acetate (mg/L) | 58.78 | 1.22 | 37.02 | 1.43 | 42.95 | 0.49 | 54.12 | 0.97 | 32.96 | 1.87 | 40.78 | 0.16 |
| Methanol (mg/L) | 95.62 | 4.72 | 70.08 | 6.05 | 84.32 | 1.70 | 132.95 | 5.31 | 121.24 | 3.46 | 132.15 | 5.03 |
| 2,3-butanedione (mg/L) | 2.87 | 0.03 | 4.29 | 0.37 | 7.01 | 0.55 | 3.98 | 0.12 | 4.52 | 0.21 | 8.97 | 0.65 |
| Isobutanol (mg/L) | 30.13 | 0.91 | 25.84 | 1.21 | 27.56 | 0.19 | 39.47 | 0.86 | 37.20 | 0.37 | 40.28 | 2.22 |
| Isoamyl acetate (mg/L) | 3.78 | 0.01 | 2.87 | 0.04 | 3.08 | 0.01 | 4.86 | 0.06 | 2.48 | 0.02 | 3.30 | 0.11 |
| Isoamyl (mg/L) | 210.16 | 7.35 | 192.01 | 1.89 | 201.16 | 5.34 | 281.31 | 4.42 | 253.94 | 4.17 | 272.62 | 3.88 |
| 3-OH-2-butanone (mg/L) | 0.68 | 0.12 | 0.83 | 0.02 | 2.74 | 0.34 | 1.00 | 0.08 | 1.98 | 0.05 | 4.47 | 0.22 |
| Ethyl lactate (mg/L) | 3.14 | 0.15 | 17.52 | 0.88 | 19.50 | 1.17 | 5.40 | 1.14 | 25.13 | 1.90 | 29.11 | 2.00 |

| | Cabernet Sauvignon | | | | | | Tinto Pámpana Blanca | | | | | |
|---------------------------------|--------------------|------|--------|------|--------|-------|----------------------|------|--------|-------|--------|------|
| | Control | | C22L9 | | PN4 | | Control | | C22L9 | | PN4 | |
| | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD |
| Minor volatile compounds | | | | | | | | | | | | |
| Acetaldehyde (mg/L) | 10.40 | 0.32 | 2.70 | 0.57 | 5.28 | 0.28 | 11.35 | 0.21 | 3.11 | 0.13 | 3.48 | 0.39 |
| Ethyl acetate (mg/L) | 28.42 | 0.54 | 22.15 | 0.07 | 25.57 | 1.38 | 25.43 | 0.86 | 24.44 | 7.82 | 28.14 | 1.54 |
| Methanol (mg/L) | 113.44 | 2.60 | 124.83 | 1.71 | 129.96 | 5.96 | 67.34 | 3.22 | 86.23 | 5.55 | 74.89 | 4.97 |
| 2,3-butanedione (mg/L) | 0.87 | 0.28 | 3.94 | 0.20 | 5.73 | 0.58 | 0.88 | 0.31 | 1.64 | 0.29 | 4.36 | 0.55 |
| Isobutanol (mg/L) | 44.06 | 0.62 | 44.18 | 1.16 | 46.73 | 0.22 | 48.65 | 1.12 | 52.24 | 2.10 | 51.66 | 0.54 |
| Isoamyl acetate (mg/L) | 1.41 | 0.02 | 0.95 | 0.00 | 1.19 | 0.07 | 0.76 | 0.04 | 0.50 | 0.19 | 0.67 | 0.06 |
| Isoamyl (mg/L) | 388.21 | 5.35 | 402.31 | 8.17 | 415.87 | 23.34 | 278.38 | 6.23 | 312.25 | 12.45 | 302.57 | 4.35 |
| 3-OH-2-butanone (mg/L) | 0.58 | 0.04 | 2.81 | 0.19 | 3.27 | 0.05 | 0.88 | 0.02 | 2.02 | 0.01 | 4.12 | 0.33 |
| Ethyl lactate (mg/L) | 6.29 | 0.12 | 25.30 | 0.21 | 27.23 | 0.07 | 2.15 | 0.26 | 30.76 | 0.88 | 27.23 | 0.75 |

Figure 1 shows the total implantation values (%) of the strains *O. oeni* C22L9 and *O. oeni* PN4 in each of the fermentations (V1 and V2) and for each wine variety. It has been calculated taking into account isolates from all the stages in each of the fermentations. It can be observed that *O. oeni* C22L9 was able to colonize fermentations with a higher implantation value in Tempranillo, Syrah and Tinto Pámpana Blanca wines, while that in Cabernet Sauvignon it showed a lower colonizing ability.

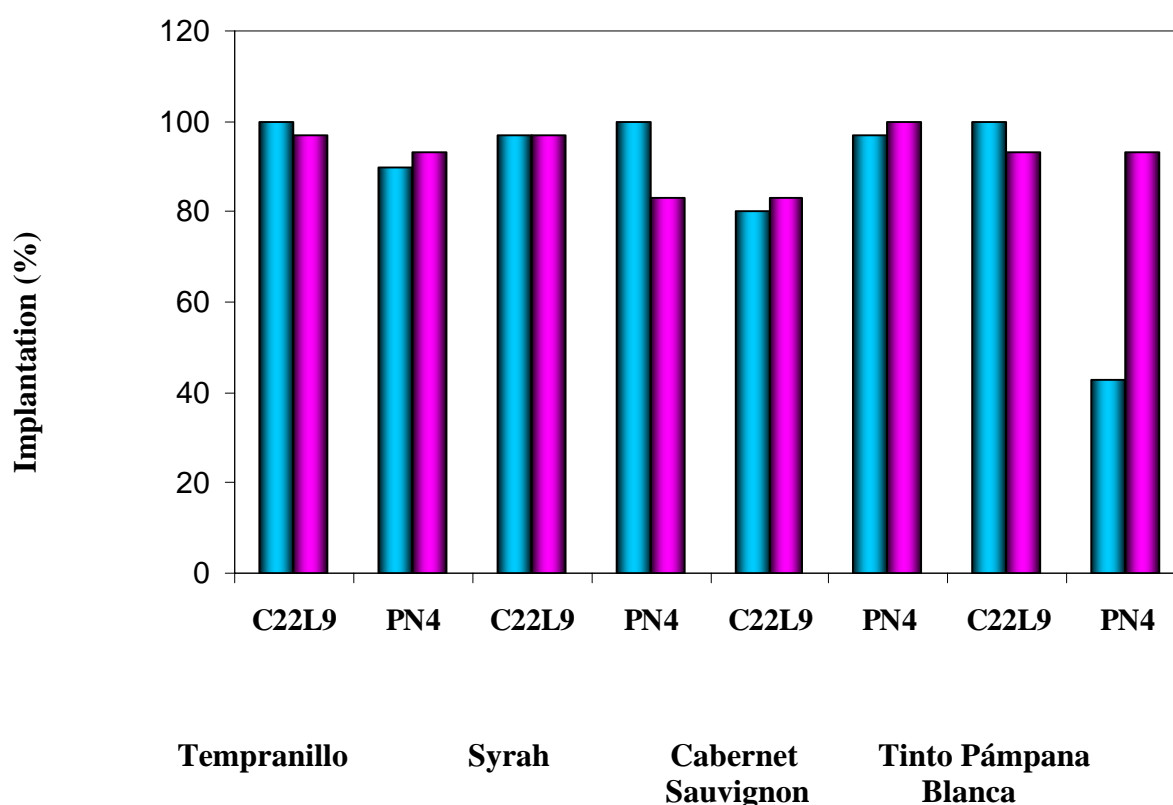


Fig. 1. Total implantation values (%) of the *O. oeni* C22L9 and PN4 strains in each of the fermentations (V1 and V2) and for each wine variety. ■ V1, ■ V2

Results of the triangular test showed that 8 of the 12 assessors correctly identified wines obtained from each of the strains. According to ISO Standard 4120, it can be concluded that significant differences between the samples exist, at a significance level of 95%. Wines fermented with *O. oeni* C22L9 was preferred by 65% of assessors.

4. Discussion

Counts obtained in both fermentations in all wines were similar to those reported by other authors (Lonvaud-Funel 1999, Ruiz et al. 2008). However, major differences were observed in MLF duration, possibly due, among other factors, to differences in the chemical characteristics of wines. The low pH and the high alcohol content in Syrah, Cabernet Sauvignon and Tinto Pámpana Blanca wines make them a very harsh environment for bacterial growth, making longer MLF, if compared with Tempranillo wine. Many authors (Lonvaud-Funel 1999, du Plessis et al. 2004, Reguant et al. 2005)

have reported similar results affirming that MLF is influenced by factors such as the pH, temperature, wine composition and even the yeast strains participating in the alcoholic fermentation.

The highest decrease in the total acidity was observed in Syrah wine inoculated with *O. oeni* C22L9, while the highest increase in pH occurred in the same variety of wine inoculated with *O. oeni* PN4. Higher decreases in citric acid content were obtained with *O. oeni* PN4, which were especially significant in Tempranillo, Syrah and Tinto Pámpana Blanca wines. Citric acid metabolism has been correlated with the synthesis of acetic acid, diacetyl and acetoin (Ribéreau-Gayon et al. 2000, López-Rituerto et al. 2009) and, therefore, a high degradation of this compound may cause undesirable defects in wines. *O. oeni* C22L9 showed as a low citric acid degrader, which is an appreciate characteristic for strains to be used as culture starter.

The abundance of putrescine at all wine varieties has been reported frequently. This amine is a common component of grapes, being its presence associated with potassium-poor soils (Broquedis et al. 1989, Vaz de Arruda Silveira et al. 2001). With respect to the increase in histamine concentration observed in Tempranillo wine inoculated with *O. oeni* C22L9, it is import to highlight that the reached concentration was well below to those reported by other authors (Gerbaux and Nonamy 2000, Izquierdo et al. 2008) and to that reported to cause certain undesirable physiological effects (20 mg/L) (Bauza et al. 1995).

Values obtained for isoamyl acetate concentration in control wines differed with the variety of wine but in all the assayed wines it decreased during MLF, with *O. oeni* C22L9 causing the highest decreases. Different authors have reported that isoamyl acetate concentration may either increase (Laurent et al. 1994) or decrease (Gil et al. 1996) depending of the strain. It is one of the compounds that hydrolyse most quickly in acid conditions and it is also strongly affected by the esterases produced by lactic bacteria.

On the contrary, ethyl lactate concentration suffered an important increase that, with the exception of Tinto Pámpana Blanca wine, was higher for wines inoculated with *O. oeni* PN4. This compound is an important by-product in the metabolism of lactic acid bacteria, lending wines highly appreciated milky notes and a sensation of volume (Davis et al. 1985).

As reported by many authors, 2,3-butanedione and its reduced form, 3-OH-2-butanone were also produced during MLF (Laurent et al., 1994). These compounds give the wine aromatic complexity, with notes of butter, contributing positively to aroma and organoleptic quality. However, diacetyl concentrations above 5–7 mg/L are undesirable for wines (Martineau and Henick-Kling 1995). In this study, *O. oeni* PN4 produced higher quantities of this compound, with values higher than 5 mg/L in Tempranillo, Syrah and Cabernet Sauvignon wines, while *O. oeni* C22L9 produced intermediate concentrations between 1.6 and 4.5 mg/L. Therefore, it would not be expected that wines inoculated with the selected strain *O. oeni* C22L9 displayed defects attributable to the presence of this compound.

When cluster analysis of RAPD-PCR patterns was used to study the ability of the autochthonous selected *O. oeni* C22L9 and the commercial *O. oeni* PN4 strains to grow and undergo MLF in simulated laboratory microvinifications, it was observed that *O. oeni* C22L9 showed a greater ability to colonize fermentations in Tempranillo, Syrah and Tinto Pámpana Blanca wines, while *O. oeni* PN4 showed a higher implantation value in Cabernet Sauvignon wine. It is important to highlight that *O. oeni* C22L9 showed a high implantation rate in all wine varieties in spite of the high alcohol content and low pH of some of them. Autochthonous LAB strains, such as strain *O. oeni* C22L9, are strong competitors as starter cultures due to their well adapted physiological state that allow them to overcome the inhibition in wine (Ribéreau-Gayon et al. 2000).

Results from preliminary sensory analysis indicated that exist some differences between wines obtained from each strain, and in consequence a detailed analysis descriptive should be performed to obtain additional information on the reasons of these differences.

According to the results previously presented, it can be concluded that strain *O. oeni* C22L9 could be used as starter cultures for MLF in wines in order to guarantee that this process proceeds successfully, even when pH and alcohol content make the conditions unsuitable for growth of lactic acid bacteria. In addition, wines obtained with this strain showed good chemical and sensory characteristics lending to affirm that it is a strain with excellent properties for use at industrial level. However, these results need to be confirmed in vinifications on an industrial scale, because experimental conditions in wineries are extremely harsh and more complex, and with additional sensory analyses.

Acknowledgements

The authors wish to thank Consejería de Educación y Ciencia of the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (JCCM) for the project PCC 05-003-2 and Ministerio de Educación y Ciencia (INIA) for the project RM 2006-00011-C02-02. P. Ruiz is supported by a grant of the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

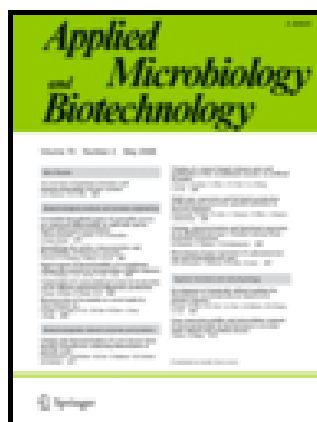
References

- Agouridis, N., A. Bekatorou, P. Nigam and M. Kanellaki, 2005. Malolactic fermentation in wine with *Lactobacillus casei* cells immobilized on delignified cellulosic material. J. Agric. Food Chem. 53, 2546-2551.
- Bauza, T., A. Blaise, J.P. Mestres, P.L. Teissedre, J.C. Cabanis, G. Kanny and A. Moneret- Vautrin, 1995. Les amines biogènes du vin. Métabolisme et toxicité . Bulletin OIV 767-776, 42-67.
- Beelman, R.B., F.J. McArdle and G.R. Duke, 1980. Comparison of *Leuconostoc oenos* strains ML-34 and PSU-1 to induce malolactic fermentation in Pennsylvania red table wines. Am. J. Enol. Vitic. 31, 269-276.
- Britz, T.J. and R.P. Tracey, 1990. The combination effect of pH, SO₂, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. J. Appl. Bacteriol. 68, 23-31.
- Broquedis, M., B. Dumery, and J. Boucard, 1989. Mise en évidence de polyamines (putrescine, cadaverine, nor-spermidine, spermidine, spermin) dans les feuilles et les grappes de Vitis Vinifera. Conn. Vigne Vin 23, 1-6.
- Coucheney, F., N. Desroche, M. Bou, R. Tournet-Maréchal, L. Dulau and J. Guzzo, 2005. A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. Int. J. Food Microbiol. 105, 463-470.
- Davis, C.R., D. Wibowo, R. Eschenbruch, T.H. Lee and G.H. Fleet, 1985. Practical implications of malolactic fermentation: a review. Am. J. Enol. Vitic. 36, 290-301.
- du Plessis, H.W., L.M.T. Dicks, I.S. Pretorius, M.G. Lambrechts and M. du Toit, 2004. Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. Int. J. Food Microbiol. 91, 19-29.
- European Union, 1990. Commission Regulation determining Community methods for the analysis of wine. 2676/90. Brussels.
- Gerbaux, V. and C. Nonamy, 2000. Les amines biogènes dans les vins de Bourgogne. 1^a partie: teneurs, origine et maîtrise dans les vins. Rev. Franc. d'Oenol. 183.

- Gil, J.V., J.J. Mateo, M. Jiménez, A. Pastor and T. Huerta, 1996. Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeast. *J. Food Sci.* 61, 1247-1266.
- Gómez-Alonso, S., I. Hermosín and E. García-Romero, 2007. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ion as aminoenones derivatives in wine and beer samples. *J. Agric. Food Chem.* 55, 608–613.
- Guerrini, S., A. Bastianini, G. Blaiotta, L. Granchi, G. Moschetti, S. Coppola, P. Romano and M. Vicenzini, 2003. Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical Italian wines. *Int. J. Food Microbiol.* 83, 1-14.
- Henick-Kling, T., W.E. Sandine and D.A. Heatherbell, 1989. Evaluation of malolactic bacteria isolated from Oregon wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2010-2016.
- ISO Standard 4120, 1983. Sensory Analysis. Methodology Triangular Test.
- Izquierdo, P.M., E. García, S. Gómez and M.L.I. Palop, 2008. Changes in the aromatic composition of Tempranillo wines during spontaneous malolactic fermentation. *J. Food Compost. Anal.* 21, 724-730.
- Izuagbe, Y.S., T.P. Dohman, W.E. Sandine and D.A. Heatherbell, 1985. Characterization of *Leuconostoc oenos* isolated from Oregon wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 680-684.
- Larisika, M., H. Claus and H. Köning, 2008. Pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of *Oenococcus oeni* isolates from different wine-growing regions in Germany. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 171-176.
- Laurent, M.H., T.E. Acree and T. Henick-Kling, 1994. Changes in aroma and odor of Chardonnay due to malolactic fermentation. *Weinwiss.* 49, 3-10.
- Le Jeune, C. and A. Lonvaud-Funel, 1997. Sequence of DNA 16S/23S spacer region of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*): Application to strain differentiation. *Res. Microbiol.* 148, 79-86.
- Lonvaud-Funel, A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Anton. Leeuw. Int. J.* 76, 317-331.
- López-Rituerto, E., S. Cabredo, M. López, A. Avenoza, J.H. Busto and J.M. Peregrina, 2009. A thorough study on the use of quantitative ^1H NMR in rioja red wine fermentation processes. *J. Agric. Food Chem.* 57, 2112-2118.
- Maicas, S., 2001. The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 35-39.

- Martineau, B. and T. Henick-Kling, 1995. Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 526-536.
- Nielsen, J.C., C. Pahl and A. Lonvaud-Funel, 1996. Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-dried *Leuconostoc oenos* cultures. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 42-48.
- Reguant, C., R. Carreté, N. Ferrer and A. Bordons, 2005. Molecular analysis of *Oenococcus oeni* population dynamics and the effect of aeration and temperature during alcoholic fermentation on malolactic fermentation. *Int. J. Food Sci. Technol.* 40, 451-459.
- Ribéreau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Donèche and A. Lonvaud-Funel, 2000. *Handbook of Enology: the Microbiology of Wine and Vinifications*. Wiley & Chichester.
- Rodas, A.M., S. Ferrer and I. Pardo, 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 412-422.
- Ruiz, P., P.M. Izquierdo, S. Seseña and M.Ll. Palop, 2008. Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiol.* 25, 942-948.
- Ruiz, P., P.M. Izquierdo, S. Seseña and M.Ll. Palop, 2009. Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results. *Int. J. Food Microbiol.* (in press).
- Ruiz-Barba, J.L., D.P. Cathcart, P.J. Wamer and R. Jiménez-Díaz, 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2059-2064.
- Vauterin, L. and P. Vauterin, 1992. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *Eur. Microbiol.* 1, 37-41.
- Vaz de Arruda Silveira, R.L., E. Malavolta and F. Broetto, 2001. Effect of potassium on dry matter production and concentration of putrescine, spermidine and spermine in *Eucalyptus grandis* progenies. *Scient Foresta* 59, 13-25.

- Wibowo, D., R. Eschenbruch, C.R. Davis, G.H. Fleet and T.H. Lee, 1985. Ocurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: A review. Am. J. Enol. Vitic. 36, 302-313.
- Zapparoli, G., C. Reguant, A. Bordons, S. Torriani and F. Dellaglio, 2000. Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Ramdomly Amplified Polymorphic DNA-PCR. Curr. Microbiol. 40, 351-355.



Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a culture-independent method (PCR-DGGE)

Ruiz, P., Seseña, S., Izquierdo, P.M. y Palop, M.LI.

Appl. Microbiol. Biotechnol. (En revisión)

Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a culture-independent method (PCR-DGGE)

Patricia Ruiz^a, Susana Seseña^a, Pedro Miguel Izquierdo^b, María Llanos Palop^{a,*}

^a Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Universidad de Castilla-La Mancha, Avda. Carlos III s/n, 45071, Toledo, Spain

^b Instituto de la Vid y del Vino de Castilla-La Mancha, Crta. Toledo-Albacete s/n, 13700, Tomelloso (Ciudad Real), Spain

* Corresponding author. Tel.: +34-925-265-716; fax: +34-925-268-840.

E-mail address: MariaLlanos.Palop@uclm.es (M.Ll. Palop)

Abstract

The bacterial population during malolactic fermentation of Tempranillo wine was studied using a culture-independent method, the PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), and the results were compared to those previously obtained for the same samples from a culture-dependent method. The results showed that *O. oeni* was the predominant species in the malolactic fermentation of Tempranillo wines, although the presence of *Lactobacillus casei*, *Gluconobacter oxydans*, *Asaia siamensis*, *Serratia* sp. and *Enterobacter* sp. was also observed. The results were at least partly coincidental with those from the culture-dependent method, although it may be concluded that neither of the methods studied reveal the real bacterial community present in the process and, therefore, an approach that combines a culture-independent method and a culture-dependent method would be advisable for a more complete knowledge of the bacteria present during malolactic fermentation of Tempranillo wine.

Keywords: Malolactic fermentation, Tempranillo wine, RAPD-PCR, PCR-DGGE

1. Introduction

Malolactic fermentation (MLF), a process in which L-malate is converted into L-lactate and carbon dioxide, has been described as having a significant influence on wine quality (Henick-Kling 1993; Lonvaud-Funel 1999). Lactic acid bacteria (LAB) are responsible for this process, although other species of bacteria may also be present (Bae et al. 2006; Renouf et al. 2007).

Information regarding the composition and dynamics of microbial communities throughout the vinification process is always useful to control the process, which will contribute to improving wine quality. Both traditional and molecular methods have been used to study the microbial population dynamics during wine fermentation, mainly those of yeasts and LAB, which has allowed for a better understanding of the relations and interactions between the different species involved (Andorrà et al. 2008; Reguant and Bordons 2003; Renouf et al. 2007).

In recent years, randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) has been frequently used in the genetic characterization of strains of bacteria participating in different food fermentations, including MLF (Coppola et al. 2006; Lechiancole et al. 2006; Rodas et al. 2005; Ruiz et al. 2010; Sánchez et al. 2004; Zapparoli et al. 2000). This culture-dependent method provides significant insight into specific isolates and microbial populations, but it is well known that only a small proportion of microorganisms are cultivable and, therefore, culture-dependent techniques often result in an incomplete representation of the true bacterial diversity present (Amann et al. 1995; Hugenholtz et al. 1998). Thus, recent microbial ecology studies of foods have employed novel culture-independent molecular approaches, such as those that use polymerase chain reaction amplification with different primers, in combination with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) or temporal temperature gradient electrophoresis (TTGE) (Ampe et al. 2001; Ercolini 2004; Meroth et al. 2003; Miambi et al. 2003). These methods allow for a rapid detection of individual species and offer a profile of the changes in community structure with time (Lopez et al. 2003; Pérez Pulido et al. 2005). They have revealed microbial constituents and microbial interactions not observed by previous plating analysis (Giraffa and Neviani 2001), although they also present some limitations (Prakitchaiwattana et al. 2004).

Some recent studies that use PCR-DGGE to examine the bacterial population during winemaking have been reported. Bae et al. (2006) used PCR-DGGE to examine

bacteria growing in enrichment cultures from wine grapes cultivated in Australia, and reported that the main malolactic bacterium, *O. oeni*, could not be isolated using this method. On the contrary, Renouf et al. (2006) reported that this technique made it possible to follow the evolution of the predominant species during laboratory microvinification and in several winemaking chateaux, although they proposed (Renouf et al. 2007) to use it in combination with population enumeration in selective media in order to monitor microbial changes at all stages of production, since it does not provide quantitative data.

Spano et al. (2007) used PCR-DGGE to study bacterial populations in red wine and reported that it may be considered a reliable technique to monitor the bacterial starters extensively used in fermented beverages. On the other hand, Andorrà et al. (2008) reported that it is ideal for detecting species diversity in a mixed population with similar relative proportions, although the massive presence of a species did decrease the chances of detecting other minor species.

The aim of this research was to study the bacterial population during spontaneous MLF of Tempranillo wine produced in two vintages at cellars in Castilla-La Mancha (Spain), using PCR-DGGE, in order to complete and compare the results previously obtained from a culture-dependent method.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

Samples of Tempranillo wine were taken during the 2006 and 2007 vintages at five wineries (A-E) located in four provinces of the Castilla-La Mancha region (Spain). The wineries were selected because they had never used commercial starters for MLF. The winemaking process involves manual harvesting of grapes, followed by the vinification practices typical of this wine-producing area. Briefly, they consist of a controlled alcoholic fermentation at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ in stainless steel tanks or jars, followed by spontaneous MLF.

Two batches (I and II) were sampled at each winery. The samples were aseptically collected at the end of alcoholic fermentation (stage 0) and at the middle and the end of MLF (stages 1 and 2, respectively). The criterion for defining the middle and the end of MLF was the content of L-malic acid in wines, which was determined using

the enzymatic test purchased from Boehringer (Boehringer Mannheim; Mannheim, Germany). The samples were kept refrigerated until analysis.

2.2. Bacterial strains and culture conditions

The reference strains *Lactobacillus plantarum* CECT 4645, *L. casei* CECT 4045, *L. hilgardii* CECT 4659, *Leuconostoc mesenteroides* CECT 394, *Oenococcus oeni* CECT 218, *Gluconobacter oxydans* CECT 4009, *Serratia rubidaea* CECT 868 and *Enterobacter gergoviae* CECT 857, from the Spanish Type Culture Collection (CECT), were used in this study.

Following CECT recommendations, the *Lactobacillus* and *Leuconostoc* species were grown in MRS broth (Scharlab, Barcelona, Spain), *O. oeni* was grown in MLO broth (Scharlab), *Gluconobacter oxydans* was grown in mannitol medium (Scharlab), and the *Serratia* and *Enterobacter* species were grown in trypticasein soy broth (Pronadisa, Madrid, Spain). All cultures were incubated at 30°C.

2.3. Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) analysis

2.3.1. DNA extraction

DNA extraction kit (DNeasy Blood & Tissue Handbook) supplied by Izasa (Barcelona, Spain) was used. A total of 1.5 mL of wine were centrifuged (10 min, 5000 x g, 4°C) and the pellet was resuspended in 180 µL of lysis buffer (24 g/L Tris; 7.4 g/L EDTA; 1.2% Triton; 40 mg/mL lysozyme (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain)) and incubated at 37°C for 30 min. Subsequently, 25 µL of proteinase K and 200 µL of lysis buffer were added and, after mixing for 20 s, incubated at 56°C for 30 min. 200 µL of ethanol (96%-100%) (Panreac, Barcelona, Spain) were added and mixed for 20 s. The mixture was transferred to a DNeasy Mini spin column placed in a 2-mL collection tube and centrifuged (1 min, 6000 x g, 25°C). The DNeasy Mini spin column was placed in a new 2-mL collection tube and 500 µL of wash buffer (Izasa) were added. Following another centrifugation (3 min, 18000 x g, 25°C), the DNeasy Mini spin column was placed in a clean 1.5-mL microcentrifuge tube and 50 µL of elution buffer (Izasa) were added. After centrifugation (1 min, 6000 x g, 25°C), the DNA was stored at -20°C.

2.3.2. PCR amplification of the microbial community 16S rRNA gene

The denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) samples were prepared by two successive PCR amplifications (nested PCR), using the primer pairs described elsewhere (Ogier et al. 2002). First, a 700-bp fragment of the 16S rRNA gene that

included the V3 region was amplified. The PCR was carried out in a total volume of 50 μ L, containing 5 μ L of 10x *Taq* reaction buffer, 2 mM $MgCl_2$, each dNTP (Biotools) at a concentration of 200 μ M, 1 μ M primer W01 (5'-AGAGTTTGATC[AC]TGGCTC-3'), 1 μ M primer W012 (5'-TACGCATTTACACC[GT]CTACA-3'), 2.0 U of *Taq* polymerase (Biotools) and 10 μ L of template DNA. The amplification program was 96°C for 2 min; 30 cycles of 96°C for 1 min, 50°C for 30 s, and 72°C for 1 min; and, finally, 72°C for 2 min.

Secondly, the 700-bp fragment was used to amplify the V3 region as described by Ogier et al. (2002) using the primers HDA1-GC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGG GAGGCAGCAGT-3') and HDA2 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3'). The PCR was carried out in a total volume of 50 μ L, containing 5 μ L of 10x NH_4^+ buffer, 2 mM $MgCl_2$, each dNTP at a concentration of 200 μ M, 1 μ M of each primer, 2.0 U of *Taq* polymerase (Ecogen, Madrid, Spain) and 1 μ L of the amplified 700-bp fragment. The amplification program was 94°C for 2 min; 30 cycles of 94°C for 1 min, 58°C for 30 s, and 72°C for 1 min; and, finally, 72°C for 7 min. The sizes and quantities of the PCR products were determined using 1.5% agarose gel electrophoresis.

2.3.3. PCR amplification of the *rpoB* gene

Primers *rpoB1* (5'-ATTGACCACTTGGGTAAACCGTCG-3'), *rpoB10* (5'-ATCGATCACTTAGGCAATCGTCG-3') and *rpoB2* (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGGCACGATCAC GGGTCAAACCACC-3'), were used to amplify a 336-bp region of the *rpoB* gene (Renouf et al. 2006), were also assayed in this study. Primer *rpoB2* has a GC-rich clamp DNA sequence that improves DGGE separation (Schefffield et al. 1989). The reactions were carried out in a total volume of 50 μ L, containing 5 μ L of 10x NH_4 buffer, 2 mM $MgCl_2$, each dNTP at a concentration of 200 μ M, 1 μ M of each primer, 2.0 U of *Taq* polymerase (Ecogen) and 10 μ L of template DNA. The amplification program was 94°C for 5 min; 94°C for 1 min, 58°C for 1 min, and 72°C for 1 min for the first 15 cycles, followed by 15 cycles at 52°C as the annealing temperature; and, finally, 72°C for 10 min. The sizes and quantities of the PCR products were determined using 1.5% agarose gel electrophoresis.

2.3.4. Analysis of PCR products by DGGE

The amplification products obtained as described above were subjected to DGGE analysis using the DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) on 16 cm x 16 cm x 1 mm gels. Electrophoresis was performed at 60°C in 1x TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA; pH 8.0) using 8% polyacrylamide gels containing 30%-60% urea-formamide linear denaturing gradient [100% corresponded to 7 M urea and 40% (v/v) formamide] increasing in the direction of electrophoresis for 2 h at 180 V. Following electrophoresis, the gels were fixed for 5 min in fixation buffer (10% ethanol, 0.5% acetic acid), stained for 30 min in a SYBR Green solution (Sigma-Aldrich) and photographed with a KODAK DC290 Zoom Digital Camera.

2.3.5. DNA sequencing and data analysis

In order to identify the dominant microbial populations, DGGE bands were excised from the gels immediately after staining. DNA from the selected bands was eluted in 50 µL of sterile water overnight at 4°C, cloned into the pSTBlue-1 plasmid using the Blunt Cloning Kit (Novagen, USA) and sequenced with the ABI Prism 3700 DNA analyzer (Applied Biosystems).

Homology of the 16S rRNA gene was used to determine the closest known relative species; to this end, partial 16S rRNA gene sequences were compared to those available in the GenBank database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and the European Molecular Biology Library (EMBL) (<http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/webin.html>).

3. Results

When the reference strains were analyzed in order to determine the discriminant capacity of primers *rpoB* and HDA, a poorer discrimination was obtained with the *rpoB* primers. The species *O. oeni* CECT 218 and *L. plantarum* CECT 4645, both usually present in MLF, were not separated using these primers, while they were separated with the HDA primers (data not shown). Therefore, primers HDA1-GC and HDA2 were selected for the analysis of wine samples. The remaining reference species were adequately separated by both primers.

When analyzed with primers HDA1-GC and HDA2, the profiles of samples taken at different stages during both vintages at all wineries showed the presence of a

variable number of dominant bands, ranging from 3 to 5. As an example, Fig. 1 shows the electrophoretic profiles of samples taken at different stages during both vintages in winery A.

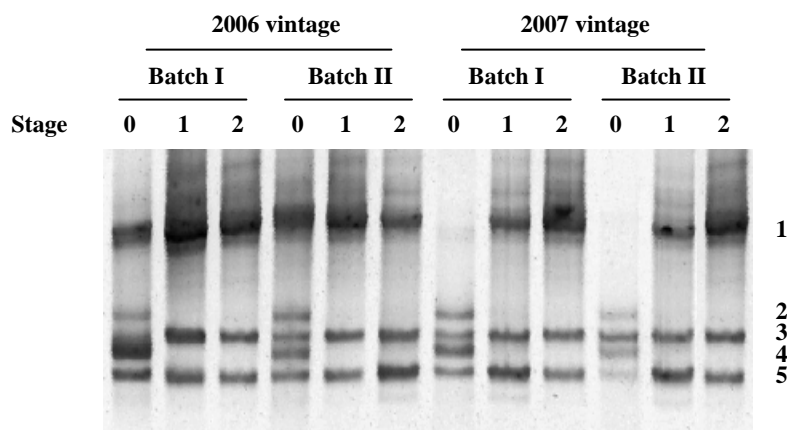


Fig. 1. DGGE patterns of PCR products obtained from samples taken at different stages during both vintages in winery A. Band 1, *O. oeni*; band 2, *L. casei*; band 3, *G. oxydans*.; band 4, *A. siamensis*; band 5, *Enterobacter* sp.

A higher number of bands were present in samples taken at the end of alcoholic fermentation (stage 0), which decreased throughout MLF. At the end of MLF (stage 2), samples from both vintages at all wineries exhibited three bands (Bands 1, 3 and 5 in Fig. 1) corresponding to the dominant species.

In order to identify the bacterial species, PCR-DGGE bands were eluted from polyacrylamide gels and sequenced. All the sequences retrieved corresponded to portions of 16S rRNA genes. Comparison of sequences from the excised bands with those available in the GenBank and the EMBL databases revealed the presence of common oenological bacteria, such as *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus casei* and *Gluconobacter oxydans*, and other less common ones, such as *Asaia siamensis*, *Serratia* sp. and *Enterobacter* sp. In addition, one band present in some samples was identified as belonging to plant chloroplasts.

The EMBL accession numbers of the sequences and the percentages of homology obtained are listed in Table 1. All sequences were $\geq 97\%$ similar to 16S rRNA fragments already found in the databases, except for band 2, which showed a 90% percent homology.

Table 1

Identities of bands obtained from the V3 region of the rRNA gene using DGGE analysis.

| No. of band | Closest relative | % Identity | Accession number |
|-------------|------------------------------|------------|------------------|
| 1 | <i>Oenococcus oeni</i> | 98 | FN395004 |
| 2 | <i>Lactobacillus casei</i> | 90 | FN395005 |
| 3 | <i>Gluconobacter oxydans</i> | 97 | FN395006 |
| 4 | <i>Asaia siamensis</i> | 98 | FN396609 |
| 5 | <i>Enterobacter sp.</i> | 98 | FN396611 |
| 6 | <i>Serratia sp.</i> | 97 | FN396610 |

As regards the presence of these species at different stages of MLF at each winery (Table 2), it is worth noting that, while *O. oeni*, *G. oxydans*, *A. siamensis* and *Enterobacter sp.* were present at all wineries, *L. casei* was only present at wineries A and B, and *Serratia sp.* was only present at wineries C, D and E.

Table 2

Species participating in different stages of MLF at each winery during both vintages from PCR-DGGE analysis.

| Winery | Vintage | Batch | Stage | <i>O. oeni</i> | <i>L. casei</i> | <i>G. oxydans</i> | <i>A. siamensis</i> | <i>Serratia sp.</i> | <i>Enterobacter sp.</i> |
|--------|---------|-------|-------|----------------|-----------------|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|
| A | 2006 | I | 0 | + | + | - | + | - | + |
| | | | 1 | + | - | + | - | - | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| | | II | 0 | + | + | + | + | - | + |
| | | | 1 | + | - | + | - | - | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| | 2007 | I | 0 | - | + | + | + | - | + |
| | | | 1 | + | - | + | - | - | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| | | II | 0 | - | + | + | + | - | + |
| | | | 1 | + | - | + | - | - | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| B | 2006 | I | 0 | - | + | + | + | - | + |
| | | | 1 | + | + | - | + | - | - |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| | | II | 0 | - | + | + | + | - | + |
| | | | 1 | + | - | + | - | - | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| | 2007 | I | 0 | - | + | + | + | - | + |
| | | | 1 | + | - | + | - | - | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| | | II | 0 | - | + | + | - | - | + |
| | | | 1 | + | + | + | - | - | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |

| | | | | | | | | | |
|---|------|----|---|---|---|---|---|---|---|
| C | 2006 | I | 0 | - | - | + | + | + | + |
| | | | 1 | + | - | + | - | + | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| | | II | 0 | + | - | + | + | + | + |
| | | | 1 | + | - | + | + | + | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| | 2007 | I | 0 | - | - | + | + | + | + |
| | | | 1 | + | - | + | - | + | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| | | II | 0 | + | - | + | - | + | + |
| | | | 1 | + | - | + | - | - | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| D | 2006 | I | 0 | - | - | + | + | + | + |
| | | | 1 | + | - | + | - | - | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| | | II | 0 | + | - | + | + | + | + |
| | | | 1 | + | - | + | + | + | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| | 2007 | I | 0 | - | - | + | + | + | + |
| | | | 1 | + | - | + | + | + | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| | | II | 0 | + | - | + | - | + | + |
| | | | 1 | + | - | + | - | - | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| E | 2006 | I | 0 | - | - | + | + | + | + |
| | | | 1 | + | - | + | - | + | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| | | II | 0 | - | - | + | + | + | + |
| | | | 1 | + | - | - | + | + | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| | 2007 | I | 0 | - | - | + | + | + | + |
| | | | 1 | + | - | + | - | - | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |
| | | II | 0 | - | - | + | + | + | + |
| | | | 1 | + | - | + | - | - | + |
| | | | 2 | + | - | + | - | - | + |

+: species was present in the sample

-: species was absent in the sample

It is worth highlighting that *G. oxydans* and *Enterobacter* sp. were present in 57 and 59 samples, respectively, of a total of 60 samples, while *O. oeni* was absent at stage 0 in 14 samples, and appeared in all samples at later stages. Only the species *O. oeni*, *G. oxydans* and *Enterobacter* sp. remained until the end of MLF (stage 2).

The band corresponding to *O. oeni* always showed the highest intensity, and it was much higher during the later stages of MLF. The intensities of the bands

corresponding to *G. oxydans* and *Enterobacter* sp. were higher at the early stages of MLF, but always lower than that of the *O. oeni* band.

4. Discussion

In this study, the bacterial community from spontaneous MLF in Tempranillo wine was analyzed using a culture-independent method.

The discriminant capacity obtained with PCR-*rpoB*/DGGE was too low to be suitable for monitoring bacterial composition during winemaking, in contrast with the results obtained by Renouf et al. (2006). These authors, who used *rpoB* primers, reported the presence of different bacterial species during winemaking, although they affirmed that detection of species present at low concentrations was difficult.

In agreement with our results, HDA primers have been successfully used by different authors for PCR-DGGE analysis (Giannino et al. 2009; Lopez et al. 2003; Pérez Pulido et al. 2005), although coamplification of non-bacterial DNA has also been occasionally reported. In our study, one band belonging to plant chloroplasts was also detected in some samples.

The band sequencing results from the profiles obtained by PCR-DGGE for the different samples were partially coincident with those reported by Renouf et al. (2006), who, using the same technique, described the presence of *O. oeni*, *L. casei* and *G. oxydans* during winemaking in different chateaux. In that study, in agreement with our results, *O. oeni* was the predominant species, which was represented by a highly intense band in most of the samples analyzed. Wine-related acetic acid bacteria, such as members of *Gluconobacter*, are often present on the surface of grapes and may represent significant populations in musts (Lonvaud-Funel 1999).

Although it has not been frequently reported, the presence of species belonging to *Serratia* and *Enterobacter* in winemaking may have its origin in the grape surface, since both genera are widely distributed in nature, occurring in the soil, plant surfaces and vegetables (Holt et al. 1994). Renouf et al. (2005) stated that these species play a significant role in the microbial consortium on grape surfaces, producing exopolysaccharides; years later, Renouf et al. (2007) described the presence of these species on grape surfaces from several vineyards in the Bordeaux area. On the other hand, Bae et al. (2006) identified *A. siamensis* in enrichment cultures from wine grapes cultivated in Australia.

Comparison of the PCR-DGGE results with those obtained from the analysis of isolates obtained from MLOA plates inoculated with the same wine samples (Ruiz et al. 2010) reveals coincident results in terms of species diversity. However, significant differences were observed in the species identified using both methods.

Thus, while *L. plantarum*, *L. hilgardii* and *Ln. mesenteroides* were only identified by plating analysis, *G. oxydans*, *A. siamensis*, *Serratia* sp. and *Enterobacter* sp. were only detected by PCR-DGGE analysis. The presence of *O. oeni* and *L. casei* was revealed by both methods. Results from other studies (Meroth et al. 2003; Miambi et al. 2003; Pérez Pulido et al. 2005) also revealed differences in the microbial composition of fermented foods depending on whether culture-dependent or culture-independent methods were used.

Enrichment cultures, such as those on MLO (*Leuconostoc oeni* medium) or MRS (Man, Rogosa and Sharpe medium), favour the detection of a group of bacteria even at low concentrations, but have the disadvantage of limiting the groups of bacteria that can be detected. In contrast, analysis of microbial populations by culture-independent methods allows for the identification of various groups of bacteria, although these must be present at higher concentrations. Renouf et al. (2007) reported that PCR-DGGE was only able to reveal the predominant species and that the detection of the numerous different species present at low concentrations was difficult using this technique. Therefore, failure to detect certain species on PCR-DGGE gel does not necessarily mean that the species are absent, but only that they are less numerous than others. Depending on the environmental conditions, the best-adapted species constitute the overwhelming majority, and the population ratio of different species can exceed 1,000-fold, making detection of minor species difficult (Renouf et al. 2007).

The limitations of PCR-DGGE analysis in ecological studies have been discussed (Prakitchaiwattana et al. 2004) and include the different affinity of the primer DNA for template DNA in different species and competitive influences when template DNAs are present in different relative amounts. Some authors (Miambi et al. 2003) have also reported that the use of the 16S rRNA gene may represent a limitation in the bacterial community analysis of vegetable samples because interferences with plant chloroplasts are possible.

From the results obtained in this study, it may be concluded that, although PCR-DGGE analysis provides a broad picture of the different groups of bacteria present in

malolactic fermentation in wine, it does not provide a complete picture either. The variations observed between the results obtained from culture-dependent and culture-independent methods suggest that a combined approach is needed to detect dominant and minor species and to better understand the bacterial ecosystem present in wine fermentation.

Moreover, it is worth highlighting that the use of a culture dependent method with a high intraspecific discrimination capacity, such as RAPD-PCR, would make it possible to obtain additional information about the participating genotypes, which may be significant from a technological point of view.

This study has provided a more complete view of the composition of the bacterial community present during MLF of Tempranillo wine produced at cellars in Castilla-La Mancha. Our research has shown the presence of the species *G. oxydans*, *A. siamensis*, *Serratia* sp. and *Enterobacter* sp. in Tempranillo wine for the first time. In addition, their significant presence in these wines suggests that it would be interesting to determine the influence that these species may have on the process and on the organoleptic properties of the wines.

Acknowledgements

The authors wish to thank the *Ministry of Education and Science (INIA-MEC)* for its financial support (project RM 2006-00011-C02-02). P. Ruiz is supported by a grant from the *Council of Communities of Castilla-La Mancha (JCCM)*.

References

- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-169
- Ampe F, Sirvent A, Zakhia N (2001) Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. *Int J Food Microbiol* 65:45-54
- Andorrà I, Landi S, Mas A, Guillamón JM, Esteve-Zarzoso B (2008) Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiol* 25(7):849-856

- Bae S, Fleet GH, Heard GM (2006) Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *J Appl Microbiol* 100(4):712-725
- Coppola S, Fusco V, Andolfi R, Aponte M, Blaiotta G, Ercolini D, Moschetti G (2006) Evaluation of microbial diversity during the manufacture of Fior di Latte di Agerola, a traditional raw milk pasta-filata cheese of the Naples area. *J Dairy Res* 29:1-9
- Ercolini D (2004) PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Methods* 56:297-314
- Giannino ML, Marzotto M, Dellaglio F, Feligini M (2009) Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *Int J Food Microbiol* 130:188-195
- Giraffa G, Neviani E (2001) DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int J Food Microbiol* 67:19-34
- Henick-Kling T (1993) In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. Ed Fleet GH, Harwood Academic Publisher, Switzerland
- Holt JH, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins Co, Baltimore, Maryland, 9th Edition
- Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR (1998) Impact of cultureindependent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 180:4765-4774
- Lechiancole T, Blaiotta G, Messina D, Fusco V, Villani F, Salzano G (2006) Evaluation of intra-specific diversities in *Oenococcus oeni* through analysis of genomic and expressed DNA. *System Appl Microbiol* 29:375-381
- Lonvaud-Funel A (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Anton Leeuw* 76:317-331
- Lopez I, Ruiz-Larrea F, Cocolin L, Orr E, Phister T, Marshall M, VanderGheynst J, Mills DA (2003) Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69:6801-6807
- Meroth CB, Walter J, Hertel C, Brandt MJ, Hammes WP (2003) Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69:475-482

- Miambi E, Guyot JP, Ampe F (2003) Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *Int J Food Microbiol* 82:111-120
- Ogier JC, Son O, Gruss A, Tailliez P, Delacroix-Buchet A (2002) Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 68:3691-3701
- Pérez Pulido R, Ben Omar N, Abriouel H, Lucas R, Martínez M, Gálvez A (2005) Microbiological study of lactic acid fermentation of caper berries by molecular and culture-dependent methods. *Appl Environ Microbiol* 71:7872-7879
- Prakitchaiwattana CJ, Fleet GH, Heard GM (2004) Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res* 4:865-877
- Reguant C, Bordons A (2003) Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *J Appl Microbiol* 95(2):344-353
- Renouf V, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2005) Numeration, identification and understanding of microbial biofilm on grape berry surface. *Aust J Grape Wine Res* 11:316-327
- Renouf V, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2007) Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:149-164
- Renouf V, Claisse O, Miot-Sertier C, Lonvaud-Funel A (2006) Lactic acid bacteria evolution during winemaking: Use of *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis. *Food Microbiol* 23:136-145
- Rodas AM, Ferrer S, Pardo I (2005) Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Int J System Evol Microbiol* 55:197-207
- Ruiz P, Izquierdo PM, Seseña S, Palop ML (2010) Analysis of lactic acid bacteria populations during spontaneous malolactic fermentation of Tempranillo wines at five wineries during two consecutive vintages. *Food Control* 21:70-75
- Sánchez I, Seseña S, Palop ML (2004) Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with “Almagro” eggplants spontaneous fermentation based on combined numerical analysis of randomly amplified polymorphic DNA and pulsed field gel electrophoresis patterns. *J Appl Microbiol* 97:446-458

- Scheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM (1989) Attachment of a 40-base pair G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci* 86:232-235
- Spano G, Lonvaud-Funel A, Claisse O, Massa S (2007) In vivo PCR-DGGE analysis of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* populations in red wine. *Curr Microbiol* 54:9-13
- Zapparoli G, Reguant C, Bordons A, Torriani S, Dellaglio F (2000) Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR. *Curr Microbiol* 40:351-355



**Producción de acidez volátil y degradación de ácido cítrico
por cepas de *Oenococcus oeni* aisladas de la fermentación
maloláctica espontánea de vinos Cencibel elaborados en
Castilla-La Mancha**

Izquierdo, P.M., Seseña, S., **Ruiz, P.** y Palop M.LI.

Vitic. Enol. Prof. 111, 37-42

Producción de acidez volátil y degradación de ácido cítrico por cepas de *Oenococcus oeni* aisladas de la fermentación maloláctica espontánea de vinos Cencibel elaborados en Castilla-La Mancha

Resumen

Con el objetivo de evaluar la producción de acidez volátil y la degradación de ácido cítrico llevada a cabo por 36 cepas de *Oenococcus oeni* aisladas de muestras de vino tomadas durante la fermentación maloláctica (FML) espontánea en 9 bodegas de Castilla-La Mancha, se han llevado a cabo microvinificaciones en un vino estéril de la variedad Cencibel en el que no se había realizado la FML. Ocho de las cepas ensayadas no completaron el proceso a los 10 días y fueron por ello descartadas, mientras que las 28 cepas restantes se comportaron de forma diferente. De los resultados obtenidos en este estudio se han seleccionado 4 cepas en las que se realizarán estudios complementarios antes de su utilización como cultivos iniciadores.

Palabras clave: Ácido cítrico, Acidez volátil, Fermentación maloláctica, *Oenococcus oeni*.

Abstract

Production of volatile acidity and degradation of citric acid by *Oenococcus oeni* strains isolated from malolactic fermentation of Cencibel wines of Castilla-La Mancha (Spain). In order to evaluate the production of volatile acidity and the degradation of citric acid produced by 36 strains of *Oenococcus oeni* isolated from wine samples taken during the spontaneous malolactic fermentation (MLF) in 9 cellars of Castilla-La Mancha (Spain), microvinifications in a sterile wine of the variety Cencibel, in which the MLF had not been realized, have been carried out. Eight of the tested strains did not complete the process to 10 days and were for that reason discarded, while the 28 remaining strains behaved differently. According to the results obtained, 4 strains in which complementary studies will be realized, before their utilization as starters, have been selected.

Key words: Citric acid, Volatile acidity, Malolactic fermentation, *Oenococcus oeni*.

Introducción

La fermentación maloláctica (FML) es una etapa clave en el proceso de elaboración de vinos tintos de calidad que, con frecuencia, ocurre de manera espontánea tras la fermentación alcohólica, por la intervención de la microbiota láctica procedente tanto de la uva como de los equipos utilizados en las bodegas. No obstante, y debido a que el vino es

un medio desfavorable para el crecimiento de estas bacterias, en ocasiones este proceso ocurre lentamente o incluso puede no llegar a producirse (VAILLANT *et al.*, 1995). Además, cuando se realiza sin ningún tipo de control pueden ocurrir cambios indeseables en los vinos como por ejemplo el aumento excesivo de la acidez volátil (MORENO-ARRIBAS *et al.*, 2003).

Actualmente, y para evitar estos pro-

blemas, se tiende a la utilización de cultivos iniciadores que contienen cepas de *Oenococcus oeni* seleccionadas. No obstante, y al objeto de mantener las características de identidad de los vinos, es siempre recomendable utilizar cepas autóctonas seleccionadas (COUCHENEY *et al.*, 2005).

La descarboxilación del ácido málico, y la consiguiente formación de ácido láctico, es un proceso intracelular que

requiere la entrada del ácido málico en las células, y que depende tanto del número de células viables como de las actividades metabólicas de las células individuales (COUCHENEY *et al.*, 2005).

Durante la FML ocurren además otros procesos que tienen como resultado un aumento de la acidez volátil. Este aumento, que suele ocurrir en la etapa final de la FML cuando el ácido málico ya ha sido degradado, está influido tanto por el tipo de bacterias lácticas presente, y en especial por el carácter homo o heterofermentador de las mismas, como por el contenido en ácido cítrico del vino (LONVAUD-FUNEL, 1999).

El ácido cítrico, cuya concentración en los vinos se encuentra en valores en torno a los 0,1–1 g/L, aporta al vino sensaciones agradables, frutales, aromáticas y muy vivas. Al ser metabolizado se produce ácido acético, como producto mayoritario, y algunos otros productos finales. Las bacterias lácticas son capaces de hidrolizar el ácido cítrico produciendo una molécula de oxalacetato y otra de acetato para, a continuación, y en el caso de *Oenococcus oeni*, descarboxilar el oxalacetato a piruvato. El piruvato a su vez da lugar a diacetilo, acetoina y 2,3-butanodiol, aunque también es fuente de otros productos, como el lactato o el etanol (RIBERAU-GAYON *et al.*, 2000). El diacetilo es un producto importante desde el punto de vista organoléptico ya que aporta aromas a mantequilla.

Es bien sabido que cuando las condiciones de crecimiento son limitantes, por ejemplo en condiciones de bajo pH, se ve aumentada la producción de sustancias acetoinicas ya que su formación supone un proceso de detoxificación para las bacterias que al eliminar el piruvato consiguen mantener el pH intracelular. Por el contrario, cuando las condiciones de crecimiento son buenas, se ve favorecida la formación de ácido acético (RIBERAU-GAYON *et al.*, 2000).

Este trabajo, es parte de un proyecto

Cuadro 1. Parámetros físico-químicos del vino

| | |
|----------------------------------|-------|
| Alcohol (%v/v) | 13,02 |
| Acidez total (g/l ác. tartárico) | 5,32 |
| pH | 3,63 |
| Acidez volátil (g/l ác. acético) | 0,32 |
| Sulfuroso total (mg/l) | 48 |
| Sulfuroso libre (mg/l) | 22 |
| Ácido málico (g/l) | 2,20 |
| Ácido láctico (g/l) | 0,02 |
| Ácido cítrico (g/l) | 0,31 |

de investigación cuyo objetivo es la selección de cepas de bacterias lácticas autóctonas, presentándose en el mismo los resultados de las microvinificaciones realizadas con algunas cepas de *Oenococcus oeni* al objeto de conocer el comportamiento de las mismas en lo que se refiere a la producción de acidez volátil y a la degradación de ácido cítrico.

Material y métodos

Cepas

Se han analizado 36 cepas de *Oenococcus oeni* procedentes de 16 muestras de vino de la variedad Cencibel tomadas en distintas etapas de la FML espontánea en 8 bodegas de Castilla-La Mancha, durante la vendimia del 2005. Estas cepas habían sido identificadas a nivel de especie mediante 16S-ARDRA (RODAS *et al.*, 2003) y a nivel

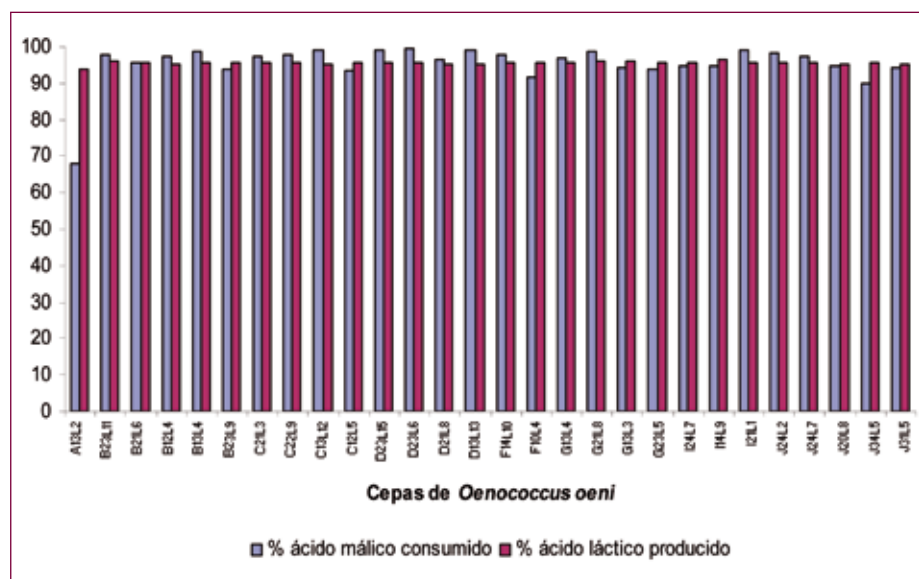
de cepa mediante electroforesis de cromosomas en campo pulsante (PFGE) (GUERRINI *et al.*, 2003) en nuestro laboratorio y se habían mantenido con un 15% (v/v) de glicerol a –80 °C.

Microvinificaciones

Se ha utilizado un vino de la variedad Cencibel elaborado en la bodega del IVICAM, al que previamente se le determinaron los siguientes parámetros físico-químicos para su caracterización: grado alcohólico, acidez total, pH, acidez volátil, sulfuroso total y sulfuroso libre, ácido málico, ácido láctico y ácido cítrico, todos ellos según los métodos oficiales de análisis (UNION EUROPEA 1990).

Las microvinificaciones se llevaron a cabo en un volumen de 100 ml de vino previamente esterilizado por filtración (0,2 micras). El vino se inoculaba al 1% con un cultivo de cuatro días de la cepa en estudio en caldo MLO (Scharlau Chemie S. A., Barcelona, Spain) suplementado con un 10% de zumo de tomate, alcanzándose una población final en el vino inoculado de aproximadamente 10⁶ células viables (ufc/ml). Las microvinificaciones se realizaron a 23 °C y se utilizó como control negativo el vino sin inocular.

Gráfico 1. Porcentaje ácido málico degradado y ácido láctico producido por las cepas ensayadas que completaron la FML.



A partir del 6º día de incubación y hasta el día 10 se tomaron muestras de vino en las que se determinó la concentración de ácido málico y de ácido láctico. Una vez finalizada la FML se determinó el pH, la acidez total, la acidez volátil, el contenido en ácido cítrico y la población viable (ufc/ml) mediante siembra en placas de MLO que se incubaron a 30 °C en anaerobiosis durante 5 días.

Resultados y discusión

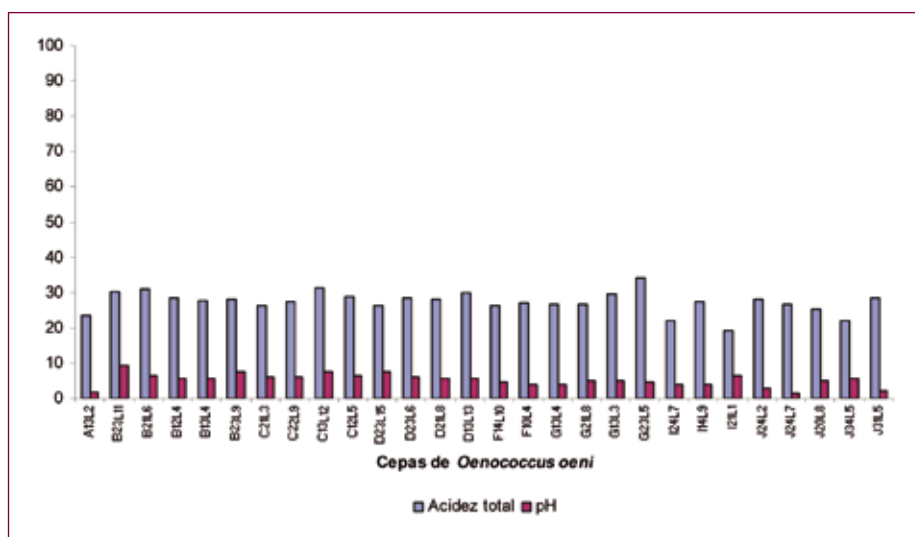
En el *Cuadro 1* se presentan los valores de los parámetros físico-químicos analizados en el vino utilizado para llevar a cabo las microvinificaciones.

De los resultados de los ensayos de microvinificación, se puede concluir que 8 de las 36 cepas de *Oenococcus oeni* estudiadas no completaron la FML tras 10 días de incubación, degradando sólo parte del ácido málico inicial disponible en el vino. El porcentaje de ácido málico degradado por estas cepas osciló entre un 11 y un 37%, de ahí que fueran consideradas como poco aptas para poder ser utilizadas como iniciadores de la FML. El descenso de la población viable observado con estas cepas al final de la FML, que en algún caso alcanzó valores en torno a $2,83 \times 10^5$ ufc/ml, explicaría que el ácido málico no se hubiera consumido en este periodo de tiempo.

No hay que olvidar que el vino es un medio hostil para el desarrollo de *Oenococcus oeni*, siendo el bajo pH, el alto contenido en alcohol y la presencia de sulfuroso factores muy limitantes para su crecimiento y con una gran influencia en la selección de las cepas capaces de transformar el ácido málico en ácido láctico (CARRETÉ *et al.*, 2006).

En el *Gráfico 1* se representan los porcentajes de ácido málico degradado y de ácido láctico producido tras la FML por cada una de las 28 cepas restantes. Todas ellas, a excepción de la cepa A13L2 que sólo degradó un 71,11% del ácido málico inicial, degradaron completamente el ácido málico disponible

Gráfico 2. Porcentaje de la disminución de la acidez total y del aumento del pH por las cepas ensayadas que completaron la FML.



en el medio, observándose un aumento de la población viable al final de la FML que llegó a alcanzar en algunos casos valores en torno a 1×10^7 ufc/ml.

Puede asimismo observarse que tanto la capacidad de degradar el ácido málico como las cantidades finales de ácido láctico producidas fueron similares en todos los casos, por lo que puede afirmarse que las cepas ensayadas han degradado exclusivamente el ácido málico y apenas ha existido degradación de los restos de azúcares que quedaron en el medio tras la fermentación alcohólica (PALACIOS *et al.*, 2007).

La duración del proceso fue variable. Así, mientras 7 de las cepas consumieron el ácido málico en 6 días, 6 lo hicieron a los 7 días, otras 6 a los 8 días, 1 a los 9 días y las 9 cepas restantes a los 10 días.

En el *Gráfico 2* se representan los cambios en la acidez total, expresada como ácido tartárico, y en el pH ocurridos en el vino tras la FML, para cada una de las 28 cepas de *Oenococcus oeni*. Puede observarse que en todos los casos y como consecuencia de la transformación maloláctica, se produce una disminución de la acidez total en torno a un 23% de valor medio, llegando a valores de 3,86 g/l y un aumento del pH

en torno a un 5% de valor medio, alcanzando valores próximos a 3,84. Las cepas que produjeron una mayor disminución de la acidez total fueron la B23L11, la B21L6, la C13L12, la D13L13 y la G23L5 mientras que el mayor aumento de pH se produjo con las cepas B23L11, B23L9, C13L12 y D23L15.

En el *Gráfico 3* se representan los cambios de la acidez volátil y del contenido en ácido cítrico en el vino tras la FML. En este caso, se observa un aumento de la acidez volátil con incrementos que oscilaron entre los 0,07 g/L y los 0,24 g/L, con un incremento medio en torno a los 0,15 g/L. El mayor incremento de acidez volátil se produjo en las microvinificaciones en las que se utilizaron las cepas B23L11, B23L9, G21L8, G23L5 e I14L9 en las que la acidez volátil final en el vino tras la FML llegó a valores de 0,55 g/l y teniendo en cuenta el valor inicial de la acidez volátil de 0,32 g/L, supondría incrementos superiores a 0,20 g/l valor considerado como normal para las cepas comerciales empleadas como starters (IZQUIERDO *et al.*, 2005). Por el contrario, las cepas que produjeron un menor incremento en la acidez volátil fueron la B21L6, la C21L3, la C22L9 y la F10L4 con las que el valor de acidez volátil final en el vino no pasó de los 0,40 g/L.

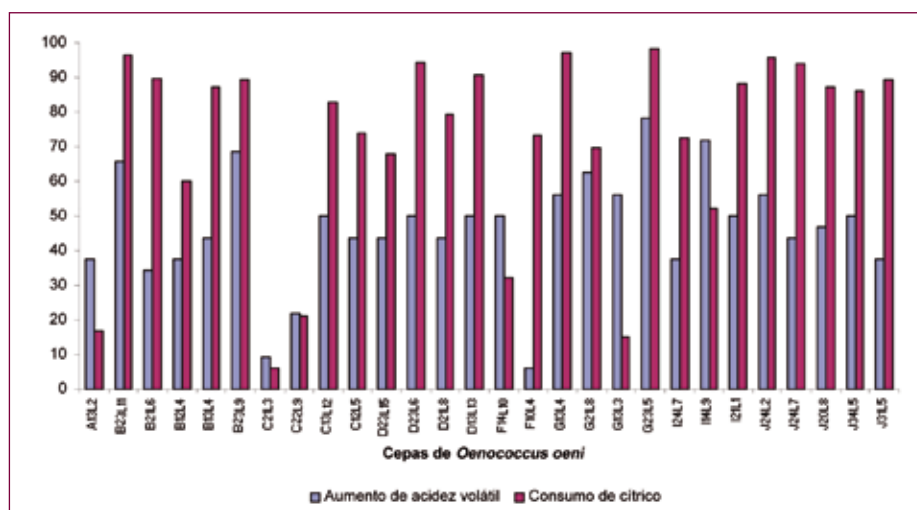
El aumento de la acidez volátil durante la FML suele ir acompañado de un descenso en el contenido en ácido cítrico que puede oscilar entre los 0,3 y los 0,1 g/L (REGUANT *et al.*, 2005). Con las 28 cepas autóctonas ensayadas en este trabajo se produjo una degradación del ácido cítrico que, aunque en algunos casos fue total, alcanzó un valor medio en torno a los 0,23 g/L, valor que coincide con los obtenidos para otras cepas de *Oenococcus oeni* aisladas en otras regiones vitivinícolas (REGUANT *et al.*, 2005).

Se ha observado en líneas generales que las cepas que aumentaron más la acidez volátil fueron las que más contenido en ácido cítrico desagradaron, aunque también se han encontrado cepas que producen poca acidez volátil pero que sí degradan gran parte del ácido cítrico disponible en el medio como es el caso de la cepa F10L4 o cepas que producen un aumento importante de la acidez volátil tras la FML aunque su consumo de ácido cítrico es bajo como es la cepa G13L3.

Cuando se limita el metabolismo secundario de las bacterias lácticas sobre el ácido cítrico, disminuye el riesgo de un incremento excesivo de la acidez volátil al final de la FML y el desarrollo de un carácter aromático láctico intenso en el vino por la producción excesiva de diacetilo, pudiendo causar la desaparición del afrutado en los vinos (KRIEGER *et al.*, 2001). Por ello, en muchas ocasiones es práctica habitual en las bodegas de la zona no completar totalmente la degradación del ácido málico e interrumpir este proceso mediante sulfitado cuando queda poco ácido málico y así las bacterias lácticas no comiencen a degradar el ácido cítrico y se produzcan aumentos muy elevados de la acidez volátil. Otra manera de prevenir este aumento excesivo de la acidez volátil sería conducir la FML a temperaturas bajas, pues la formación de acidez volátil aumenta con temperaturas más elevadas.

Conclusiones

Gráfico 3. Porcentaje del aumento de la acidez volátil y del consumo de ácido cítrico por las cepas ensayadas que completaron la FML.



Los resultados anteriormente expuestos representan una contribución inicial a la selección de cepas de bacterias lácticas autóctonas en Castilla-La Mancha. Las cepas que mejor se comportaron en cuanto a la menor producción de acidez volátil y la menor degradación del ácido cítrico fueron la B12L4, C21L3, C22L9 y F14L10 que podrían ser consideradas firmes candidatas a ser utilizadas como parte de un cultivo iniciador. No obstante, sería aconsejable realizar estudios complementarios para conocer la capacidad de producir aminas biógenas por cada una de estas cepas y otras propiedades como son la no producción excesiva de diacetilo ni carbamato de etilo de gran interés industrial.

Agradecimientos

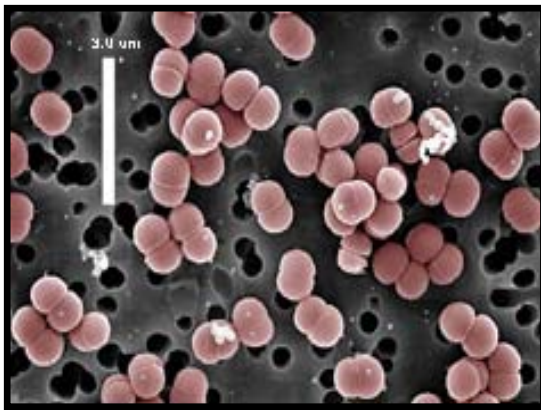
Este trabajo ha sido financiado por la Consejería de Educación y Ciencia de la JCCM proyecto PCC-05-003-2, y por el Ministerio de Educación y Ciencia (INIA) proyecto RM2006-00011-C02-02, y a las bodegas colaboradoras.

Bibliografía

CARRETÉ, R.; REGUANT, C.; ROZÈS, N.; CONSTANTÍ, M. Y BORDONS, A. (2006). Analysis of *Oenococcus oeni* strains in simulated microvinifications with some stress compounds. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57, 3, 356-362.

- COUCHENEY, F., DESROCHE, N., BOU, M., TOURDOT-MARÉCHAL, R., DULAU, L., GUZZO, J. (2005). A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 463-470.
- GUERRINI, S., BASTIANINI, A., BLAIOTTA, G., GRANCHI, L., MOSCHETTI, G., COPPOLA, S., ROMANO, P., VINCENZINI, M. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical Italian wines. *Int. J. Food Microbiol.* 83, 1-14.
- IZQUIERDO, P. M.; GARCÍA, E.; MARTÍNEZ, J.; CHACÓN, J. L. (2005). Cepas comerciales de bacterias lácticas para la inducción de la fermentación maloláctica en vinos tintos Cencibel: Eficiencia, implantación e influencia sobre la calidad. *Alimentaria*, 368, 94-100.
- KRIEGER, S.; DULAU, L.; NAVASCUÉS, E. Y PALACIOS, A. (2001). Control de la fermentación maloláctica. *Viticultura/Enología Profesional*, 73, 63-71.
- LONVAUD-FUNEL, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Anton. Leeuw.*, n 76, 317-331.
- MORENO-ARRIBAS, M. V., MARCOBAL, A., MUÑOZ, R. (2003). Alteraciones del vino por el metabolismo de las bacterias lácticas. *Tecnología del vino*, 14, 100-105.
- PALACIOS, A.; MASQUÉ, M. C.; ROMERO, S. V.; RICO, S.; ELORDUY, X.; SUÁREZ, C. Y HERÁS, J. M. (2007). Inoculación de bacterias lácticas en FML. Vinos de pH elevado (II). *La Semana Vitivinícola*, 3159, 566-572.
- REGUANT, C., CARRETÉ, R., CONSTANTÍ, M., BORDONS, A. (2005). Population dynamics of *Oenococcus oeni* strains in a new winery and the effect of SO₂ and yeast strain. *FEMS Microbiology Letters*, 246, 111-117.
- RIBÉREAU-GAYON P., DUBORDIEU D., DONÈCHE B., LONVAUD A. (2000) Handbook of Enology Vol. 1: The microbiology of wine and vinifications, John Wiley & Sons Ltd.,
- RODAS, A. M., FERRER, S., PARDO, I. (2003). 16S-ARDRA, a tool for identification of Lactic

- Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine. *System. Appl. Microbiol.* 26, 412–422.
- UNION EUROPEA (1990). Commission Regulation determining Community methods for the analysis of wines. 2676/90. Bruselas.
- VAILLANT, H.; FORMISYN, P., GERBAUX, V. (1995). Malolactic fermentation of wine: study of the influence of some physico-chemical factors by experimental design assays. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 640–650.



Pediococcus

4. Discusión general

En los últimos años, la industria enológica ha sufrido una importante transformación, convirtiéndose en un sector en constante innovación y con importantes inversiones. Este hecho ha propiciado un interés creciente por la mejora del proceso de vinificación, no sólo en lo que a infraestructuras se refiere, sino también en lo referido al proceso de fermentación, siendo cada vez más frecuente la utilización de cultivos iniciadores comerciales para favorecer el inicio tanto de la fermentación alcohólica como de la fermentación maloláctica.

La fermentación maloláctica es un proceso en el que se ha descrito la participación de diferentes especies de bacterias, siendo *Oenococcus oeni* la especie de bacteria láctica identificada con mayor frecuencia debido, entre otras razones, a su mayor tolerancia a las condiciones “adversas” que, desde el punto de vista del crecimiento microbiano, posee el vino (Lonvaud-Funel, 1999), motivo por el que los cultivos iniciadores comerciales suelen estar constituidos por cepas de esta especie.

Sin embargo, la inducción de la fermentación maloláctica mediante la inoculación de cepas comerciales de *O. oeni* no siempre es satisfactoria (Coucheney et al., 2005) y, por ello, algunos autores (Izuagbe et al., 1985; Henick-Kling et al., 1989; Nielsen et al., 1996) recomiendan la utilización de cultivos iniciadores autóctonos, bien adaptados a las condiciones específicas de cada zona o región vitivinícola.

La selección de un cultivo iniciador es una complicada tarea que requiere de un estudio de la biodiversidad y de la caracterización genética y tecnológica de la microbiota presente en el proceso espontáneo, lo que permitirá seleccionar aquellas cepas que presenten las mejores propiedades. Una vez seleccionadas, será necesario llevar a cabo un estudio de implantación, tanto a escala de laboratorio como a escala industrial, para conocer su comportamiento en condiciones reales y confirmar así la idoneidad de las mismas como cultivos iniciadores.

Se han publicado diferentes estudios para la selección de cultivos iniciadores en vinos de distintas variedades de uva (Coucheney et al., 2005; Solieri et al., 2010), pero no se ha encontrado ninguno referido a vinos de la

variedad Tempranillo, variedad más importante en la región castellano-manchega.

El objetivo final de esta Tesis Doctoral era la obtención de un cultivo iniciador, que pudiera ser utilizado tanto en bodegas de la región como en otros territorios, constituido por cepa/s autóctonas que presentaran las mejores propiedades.

Para ello, nos planteamos en primer lugar el estudio de la biodiversidad de la microbiota láctica presente en la fermentación maloláctica espontánea de vinos tintos de la variedad Tempranillo elaborados en bodegas de Castilla-La Mancha en dos vendimias consecutivas. Se tomaron muestras de vino elaborados con esta variedad de uva en 6 bodegas de 4 provincias (Albacete, Ciudad Real, Cuenca y Toledo) de Castilla-La Mancha, repitiéndose el muestreo el año siguiente. Las bodegas muestreadas se seleccionaron atendiendo al criterio de que nunca hubieran utilizado cultivos iniciadores para la fermentación maloláctica.

Para conocer la dinámica de población de las cepas durante la fermentación maloláctica, las muestras fueron tomadas en tres etapas del proceso, al final de la fermentación alcohólica y cuando se había degradado en torno al 50 y al 90% del contenido inicial de ácido málico.

Las muestras fueron sembradas en placas de agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y de agar MLO (*Oenococcus oenos* medium), medios de cultivo adecuados para el crecimiento de las bacterias lácticas.

Los recuentos de bacterias lácticas obtenidos en las placas de las muestras de las diferentes bodegas fueron similares entre sí y similares a los descritos por otros autores (Ribéreau-Gayon et al., 1998; Lonvaud-Funel, 1999). Diferencias más importantes se observaron no obstante, en la duración de la fermentación maloláctica, con valores que oscilaron entre los 7 y los 37 días. Algunos autores (Wibowo et al., 1985; Lonvaud-Funel, 1999; du Plessis et al., 2004; Reguant et al., 2005a) han descrito que la fermentación maloláctica está influenciada por numerosos factores como el pH, la temperatura, la composición del vino e incluso las cepas de levadura implicadas en la fermentación alcohólica, factores todos ellos que afectan a la población viable

de bacterias lácticas, habiéndose encontrado una buena correlación entre el progreso de la fermentación maloláctica y la población de estas bacterias.

De las placas utilizadas en los recuentos se obtuvieron un número de aislados que, tras ser purificados, fueron caracterizados genéticamente. Para ello, y con los aislados de una de las bodegas, se realizó un estudio previo en el que se ensayaron diferentes técnicas moleculares, la RAPD-PCR, la REA-PFGE y la DD-PCR, a fin de seleccionar aquella con mayor capacidad discriminante.

En la bibliografía consultada se encontraron importantes discrepancias respecto a la utilidad de estas técnicas en el genotipado de cepas de *O. oeni*. Así, y coincidiendo con nuestros resultados, Zapparoli et al. (2000) indicaron que el análisis REA-PFGE, utilizando los enzimas de restricción *Apal* y *Sfil*, tenía menor capacidad discriminante que la RAPD-PCR, y que el cebador M13 mostraba mayor eficacia discriminante que el cebador M14. Por el contrario, Lechiancole et al. (2006) describieron que la RAPD-PCR, utilizando ocho cebadores distintos tanto de forma individual como combinados, no discriminaba de forma adecuada las cepas de *O. oeni*, mientras que la REA-PFGE utilizando el enzima *Apal*, si conseguía este objetivo. De igual forma, Kelly et al. (1993) indicaron que la REA-PFGE era la mejor técnica para la diferenciación de cepas de *Leuconostoc oenos*, actual *O. oeni*.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio con las técnicas RAPD-PCR y REA-PFGE indicaron que ambas son adecuadas para el genotipado de aislados de *O. oeni*, aunque la mayor discriminación se obtuvo utilizando la RAPD-PCR con el cebador M13.

El grado de polimorfismo de los aislados de la bodega analizada obtenido con esta técnica, expresado como el cociente entre el número de aislados analizados y el número de genotipos obtenidos, fue relativamente alto comparado con los valores publicados por Lechiancole et al. (2006), pero comparable al obtenido por Zapparoli et al. (2000) para aislados de la misma especie.

Cuando los resultados obtenidos por RAPD-PCR, utilizando el cebador M13, y aquellos del análisis REA-PFGE, utilizando el enzima *Apal*, fueron

analizados conjuntamente, se observó un aumento en la capacidad discriminante, hecho que ya había sido descrito por otros autores (Ercolini et al., 2001; Sánchez et al., 2004; Aquilanti et al., 2006; Valmorri et al., 2006).

Los resultados obtenidos con la DD-PCR nos permitieron concluir que ésta no es una técnica adecuada para la caracterización genética de cepas de *O. oeni*. El bajo valor del coeficiente de similitud obtenido en el estudio de reproducibilidad indicaba que es una técnica que se ve afectada por numerosas variables siendo sensible a cualquier pequeño cambio. Lechiancole et al. (2006) en un estudio de caracterización genética de cepas de *O. oeni* indicaron, aunque de forma no concluyente, que los resultados obtenidos con la DD-PCR eran adecuados, aunque también hacían alusión a la escasa reproducibilidad de la técnica. Estos hechos hacen pensar que ésta podría ser la razón por la que la DD-PCR no ha sido utilizada en otros estudios de biodiversidad bacteriana.

Por todo ello, se consideró conveniente utilizar la RAPD-PCR para el genotipado de los aislados que habían sido obtenidos en las muestras tomadas en las dos vendimias en todas las bodegas.

Tras el genotipado de los aislados se abordó su identificación utilizando la técnica 16S-ARDRA, que permitió, como han indicado otros autores (Rodas et al., 2003), una rápida identificación de los mismos, confirmándose que *O. oeni* es también la especie predominante en la fermentación maloláctica de los vinos de la variedad Tempranillo (du Plessis et al., 2004; Coucheney et al., 2005; Renouf et al., 2007). Es bien conocido que la presencia de etanol y las bajas concentraciones de azúcares existentes al inicio de la fermentación maloláctica imponen una presión selectiva en las bacterias lácticas, siendo *O. oeni* la especie más resistente (Kunkee, 1991).

Los aislados que no fueron identificadas por 16S-ARDRA, fueron analizados con tiras API 50CHL, poniéndose de manifiesto la presencia de otras especies minoritarias como *L. casei*, *L. plantarum*, *L. hilgardii* y *Ln. mesenteroides*. La presencia de éstas durante la fermentación alcohólica y al inicio de la fermentación maloláctica ha sido descrita por otros autores (Edwards et al., 1993; Ribéreau-Gayon et al., 2000b; du Plessis et al., 2004), si

bien su viabilidad disminuye significativamente según avanza la fermentación, como consecuencia de los cambios químicos que tienen lugar. Coincidiendo con lo descrito por Renouf et al. (2006 y 2007) la mayor diversidad de especies se observó al final de la fermentación alcohólica, siendo *O. oeni* la especie dominante al avanzar la fermentación maloláctica.

La contribución de estas especies minoritarias en las características sensoriales del vino también ha sido puesta de manifiesto por diferentes autores (du Plessis et al., 2004; Bartowsky, 2009).

Los resultados obtenidos en los estudios de caracterización genética e identificación, coincidieron con los publicados por otros autores (Kelly et al., 1993; Zapparoli et al., 2000) y permitieron comprobar 1) que cuando las condiciones de elaboración son similares, la composición de la microbiota presente es, esencialmente, la misma (Sánchez et al., 2004), 2) la coexistencia de numerosas cepas de *O. oeni* durante la fermentación maloláctica y 3) la existencia de genotipos coincidentes en las muestras procedentes de diferentes bodegas, presentando algunos de los aislados procedentes de distintas bodegas, elevados porcentajes de similitud.

Los resultados del análisis de los aislados obtenidos de las muestras de la segunda vendimia confirmaron aquellos de la primera vendimia y además, pusieron de manifiesto que algunos de los genotipos volvían a estar presentes en las muestras del segundo año. Estos resultados sugieren una distribución geográfica de las cepas de *O. oeni* que crecen espontáneamente en el vino y confirman la existencia de una microbiota bien adaptada no sólo a las condiciones de elaboración utilizadas en las bodegas, sino también a las condiciones ecológicas de esta región vitivinícola, hecho ya descrito por algunos autores (Guerrini et al., 2003).

La permanencia de algunas cepas de *O. oeni* en todas las bodegas y en las dos vendimias analizadas, hizo pensar en su idoneidad para un uso industrial y fue el criterio utilizado en la selección de aquellas que iban a ser utilizadas en el estudio de caracterización tecnológica.

En la consulta bibliográfica efectuada como paso previo a la caracterización tecnológica se encontraron diversos estudios (Fayed et al.,

1986; Moreno-Arribas et al., 2003; Vaquero et al., 2004) que se utilizaron como punto de partida, si bien es necesario destacar que el estudio de caracterización planteado en esta Tesis Doctoral fue más ambicioso, ensayándose diversas propiedades de interés enológico.

En primer lugar, los aislados de *O. oeni* representantes de las cepas que habían sido seleccionadas tras la caracterización genética, fueron sometidos a un ensayo de microvinificación con el fin de estudiar la velocidad de degradación del ácido málico y poder conocer los cambios que ocurrían en la composición de los vinos. Los resultados del estudio de degradación del ácido málico pusieron de manifiesto importantes diferencias en el comportamiento de los aislados, lo que permitió seleccionar a aquellos que lo degradaron completamente y de forma rápida para los ensayos siguientes.

Cuando se efectuó el análisis físico-químico de los vinos obtenidos en la microvinificación, pudo observarse que en todos los casos, y como consecuencia de la transformación maloláctica, se producía un aumento del pH, de la acidez volátil y del contenido en ácido láctico así como una disminución de la acidez total y del contenido en ácido cítrico. El aumento de la acidez volátil estuvo acompañado por un descenso en el contenido en ácido cítrico que alcanzó un valor medio en torno a los 0,23 g/L, valor que coincide con los obtenidos para otras cepas de *O. oeni* aisladas de otras regiones vitivinícolas (Reguant et al., 2005a). Los 8 aislados que produjeron vinos con una menor acidez volátil y una menor degradación del ácido cítrico fueron seleccionados para los ensayos siguientes.

El análisis de los compuestos volátiles minoritarios en los vinos producidos por los 8 aislados seleccionados tras el análisis físico-químico, puso de manifiesto que durante la fermentación maloláctica se producía en todos ellos una disminución en la concentración de acetaldehído y un aumento en las concentraciones de diacetilo, compuesto que contribuye positivamente a la complejidad aromática y a las características organolépticas del vino (Izquierdo et al., 2008), y de lactato de etilo, compuesto que aporta a los vinos notas lácteas y sensación de volumen muy apreciadas por los consumidores (Davis et al., 1985).

Seguidamente, y en esos mismos aislados, se ensayó la presencia de diferentes actividades enzimáticas, glucosidasas, tanasas y antocianasas, de interés enológico. Es bien conocido que la actuación de las glucosidasas puede alterar el perfil aromático de los vinos (Grimaldi et al., 2005a) ya que si bien los compuestos aromáticos en forma de glucósidos no contribuyen al aroma, si lo hacen cuando quedan libres tras la actuación de estas enzimas (Boido et al., 2002; Grimaldi et al., 2005a), de ahí la importancia de su determinación. De igual forma, la producción de enzimas capaces de llevar a cabo la degradación de los taninos (tanasas), es una característica deseable en las cepas que vayan a ser utilizadas como cultivos iniciadores, ya que la oxidación de los taninos en contacto con el aire produce una turbidez indeseable que constituye un grave problema de calidad (Vaquero et al., 2004). Por el contrario, la presencia de antocianasas no es deseable en estas cepas, ya que los compuestos resultantes de la hidrólisis de los antocianos -las antocianidinas- son poco estables y se convierten fácilmente en compuestos de color marrón o incoloro (Huang, 1955; Blom, 1983).

Coincidiendo con lo descrito por Vaquero et al. (2004), los aislados de *O. oeni* ensayados no mostraron actividad tanasa ni antocianasa, mientras que por el contrario si fueron capaces de hidrolizar el enlace glucosídico de algunos de los glucósidos utilizados en el ensayo (*p*-NP- β glucopiranosido, *p*-NP- α glucopiranosido y *p*-NP- β xilopiranosido), poniendo de manifiesto que las actividades glucosidasa están ampliamente distribuidas entre las cepas de *O. oeni* (Grimaldi et al., 2005 a y b). Los valores obtenidos para estas actividades fueron del mismo orden de magnitud que los descritos para cepas de la misma especie en estudios similares (Grimaldi et al., 2005 a y b), siendo el aislado B23L9 el que mostró los valores más altos para las glucosidasas ensayadas.

En este estudio pudo asimismo observarse que la actividad glucosidasa se ve afectada, en mayor o menor medida, tanto por el pH como por el contenido en etanol, lo que permite presuponer que el comportamiento en el vino será diferente del observado cuando se utilizan soluciones tampón.

Cuando se analizó la capacidad aminobiogénica de los aislados, por el procedimiento cualitativo descrito por Bover-Cid y Holzapfel (1999), se observó

que ninguno producía un viraje del color de las placas que contenían los diferentes aminoácidos, resultados que fueron confirmados cuando se realizaron reacciones de PCR específicas para determinar la presencia de los genes de las correspondientes descarboxilasas.

En la bibliografía consultada se han encontrado discrepancias respecto a la capacidad para producir histamina por *O. oeni*. Así, mientras algunos autores describen no haber encontrado cepas de esta especie productoras (Moreno-Arribas et al., 2003; Costantini et al., 2006), otros afirman que no es raro encontrarlas (Guerrini et al., 2002; Coton et al., 2004; Landete et al., 2007). Por el contrario, se ha encontrado una gran coincidencia en relación con la capacidad para producir tiramina, cadaverina y putrescina, siendo ésta una propiedad poco habitual entre las cepas de *O. oeni* (Moreno-Arribas et al., 2003; Costantini et al., 2006; Rivas et al., 2006; Landete et al., 2007).

Seguidamente, se realizó un estudio para conocer la capacidad de implantación en vino de los 8 aislados seleccionados en las etapas anteriores. Para ello, los aislados fueron inoculados en un vino de la variedad Tempranillo, realizándose un seguimiento de los mismos por RAPD-PCR, técnica que ha sido utilizada con éxito para este fin por otros autores (Reguant et al., 2005b; Seseña et al., 2005). Los aislados *O. oeni* C22L9 y *O. oeni* D13L3 fueron los que mostraron un mejor comportamiento en este estudio, alcanzando valores medios para los porcentajes de implantación más elevados.

Cuando se analizaron sensorialmente los vinos obtenidos con estos dos aislados y otro obtenido con una cepa comercial (*O. oeni* PN4, Danstar Ferment A.G.), los catadores diferenciaron claramente cada uno de ellos, indicando su preferencia por aquel obtenido con el aislado *O. oeni* C22L9.

Los dos aislados seleccionados en el estudio de implantación mostraron además un buen comportamiento durante los ensayos de liofilización realizados tanto en el laboratorio como en la empresa Lallemand S.A., manteniendo su viabilidad tras este tratamiento, lo que supone una importante ventaja para su producción industrial.

Finalmente, y para completar este estudio, se realizó un ensayo de implantación a mayor escala (10 litros) con el aislado C22L9 y con la cepa

comercial *O. oeni* PN4, utilizando vinos de diferentes variedades de uva, Tempranillo, Syrah, Cabernet Sauvignon y Tinto de la Pámpana Blanca.

Los resultados de este estudio pusieron de manifiesto que el aislado *O. oeni* C22L9 se implanta de forma más eficaz que la cepa comercial en todas las variedades de vino, excepto en el de la variedad Cabernet Sauvignon, a pesar del alto contenido en etanol y el bajo pH de algunas de ellas.

Los resultados del análisis físico-químico de estos vinos pusieron también de manifiesto que el aislado C22L9 produce menor degradación del ácido cítrico que la cepa comercial, característica muy apreciada en las cepas que van a ser utilizadas como cultivos iniciadores, ya que de esta forma se evita una excesiva producción de diacetilo y acetoína, compuestos que pueden causar importantes defectos en el vino. Así, algunos autores (Martineau y Henick-Kling, 1995) describen que concentraciones de diacetilo superiores a 5-7 mg/L son claramente indeseables ya que proporcionan un excesivo sabor a mantequilla. En este estudio, la cepa comercial *O. oeni* PN4 produjo mayores cantidades de este compuesto que el aislado C22L9, alcanzándose concentraciones superiores a 5 mg/L en los vinos Tempranillo, Syrah y Cabernet Sauvignon, mientras que el aislado *O. oeni* C22L9 no produjo en ningún caso concentraciones superiores a 4,5 mg/L. Por lo tanto, no es de esperar que los vinos que se obtengan con el aislado seleccionado en este estudio muestren defectos atribuibles a la presencia de este compuesto.

El análisis de los compuestos volátiles minoritarios y de aminos biógenos efectuado en los vinos de todas las variedades antes y después de la fermentación maloláctica, mostró pequeñas diferencias en el comportamiento de los dos aislados ensayados, si bien la evolución de los diferentes compuestos analizados fue la habitual en este proceso. La histamina y la cadaverina mostraron contenidos muy bajos tanto antes como después de la fermentación maloláctica, si bien se observó un ligero aumento de la concentración de histamina en el vino Tempranillo inoculado con el aislado *O. oeni* C22L9. No obstante, el valor alcanzado al final de este proceso fue muy inferior a aquellos publicados por otros autores (Gerbaux y Monamy, 2000;

Izquierdo et al., 2008) y a aquellos que se ha descrito que pueden causar ciertos efectos fisiológicos indeseables (Bauza et al., 1995).

En el análisis sensorial preliminar realizado a los diferentes vinos, los catadores pusieron de manifiesto que existían diferencias entre aquellos obtenidos con cada uno de los inóculos y, en consecuencia, creemos necesaria la realización de un análisis sensorial descriptivo detallado que permita obtener información adicional sobre las causas de estas diferencias.

Los resultados del estudio de caracterización anteriormente descrito permitieron la selección de un aislado con excelentes propiedades tecnológicas para uso industrial y permiten afirmar, como han hecho otros autores (Ribéreau-Gayon et al., 2000a), que las cepas autóctonas, como la *O. oeni* C22L9, pueden ser fuertes competidoras cuando son utilizadas como cultivos iniciadores.

Tras el estudio de diversidad genética, y a la vez que se realizaba la caracterización tecnológica de los aislados, se llevó a cabo un estudio de diversidad de la población bacteriana presente en la fermentación maloláctica de los vinos de la variedad Tempranillo obtenidos en las diferentes bodegas en las dos vendimias, utilizando una técnica de las denominadas independientes de cultivo, como es la PCR-DGGE, a fin de comparar los resultados con aquellos que habíamos obtenido mediante siembra en placa.

Para la puesta a punto de la técnica se ensayaron diferentes cebadores, seleccionándose los denominados HDA (Ogier et al., 2002) con los que, y en concordancia con diferentes autores (Lopez et al., 2003; Pérez Pulido et al., 2005; Giannino et al., 2009), se obtuvieron los mejores resultados.

Los resultados de la secuenciación de las bandas obtenidas en los perfiles PCR-DGGE de las diferentes muestras y su posterior comparación con otras de las bases de datos, revelaron la presencia de las especies *O. oeni*, *L. casei*, *Gluconobacter* (*G.*) *oxydans*, *Asaia* (*A.*) *siamensis*, *Serratia* sp. y *Enterobacter* sp. Estos resultados fueron parcialmente coincidentes con los descritos por Renouf et al. (2006), quienes utilizando la misma técnica, describieron la presencia de *O. oeni*, *L. casei* y *G. oxydans* al estudiar la evolución de las bacterias lácticas durante la vinificación en diferentes

bodegas. En ese estudio, y de acuerdo con nuestros resultados, *O. oeni* fue la especie predominante, presentando una banda muy intensa en la mayoría de las muestras analizadas.

Los restantes géneros también han sido encontrados por otros autores en la superficie de la uva, pudiendo representar poblaciones importantes en los mostos (Holt et al., 1994; Lonvaud-Funel, 1999). Renouf et al. (2005) reportaron que las especies de *Enterobacter* y *Serratia* desempeñan un papel importante en el consorcio microbiano de la superficie de la uva por la producción de exopolisacáridos, y años más tarde (Renouf et al., 2007) describieron la presencia de especies de estos géneros en la superficie de uvas de diferentes viñedos de la zona de Burdeos. Bae et al. (2006) pusieron de manifiesto la presencia de *A. siamensis* en medios enriquecidos con vino de uvas cultivadas en Australia.

Cuando se compararon los resultados obtenidos en este estudio con aquellos del análisis de los aislados crecidos en las placas de agar MLO, se observaron resultados coincidentes en términos de diversidad de especies si bien, se encontraron diferencias importantes en las especies identificadas. Así, las especies *L. plantarum*, *L. hilgardii* y *Ln. mesenteroides* únicamente fueron identificadas tras la siembra en placa, mientras que las especies *G. oxydans*, *A. siamensis*, *Serratia* sp. y *Enterobacter* sp. sólo pudieron ser detectadas mediante el análisis PCR-DGGE. Las especies *O. oeni* y *L. casei* fueron puestas de manifiesto por ambos métodos.

Estos resultados permiten afirmar que la siembra en medios selectivos, como el MLO o el MRS, método habitualmente utilizado en estudios de biodiversidad microbiana, favorece la detección de un grupo de bacterias incluso si sus poblaciones son bajas, pero presenta el inconveniente de limitar los grupos de bacterias que pueden ser detectados. Por el contrario, el análisis de poblaciones bacterianas utilizando métodos independientes de cultivo, permite la identificación de diversos grupos de bacterias, aunque éstos deben estar presentes en elevadas concentraciones. Estos resultados coinciden con los publicados por Renouf et al. (2007), quienes describieron que la PCR-DGGE sólo era capaz de revelar las especies predominantes, siendo difícil la

detección de numerosas especies presentes en bajas concentraciones. Por lo tanto, el hecho de que no se detecten determinadas especies en el análisis PCR-DGGE no siempre significa que dichas especies están ausentes, pudiendo estar presentes aunque de forma menos abundante.

Puede entonces concluirse que, si bien el análisis PCR-DGGE proporciona una imagen más amplia de la población bacteriana presente en la fermentación maloláctica del vino, no da tampoco una imagen completa de la misma. Las diferencias en los resultados obtenidos con los métodos dependientes e independientes de cultivo sugieren la conveniencia de realizar estudios combinados utilizando ambos tipos de métodos, a fin de detectar tanto las especies dominantes como las minoritarias, lo que permitirá tener un mejor conocimiento de la ecología bacteriana que existe en la fermentación maloláctica del vino.

Además, es importante destacar que la utilización de un método dependiente de cultivo con una alta capacidad de discriminación intraespecífica, como es la RAPD-PCR, posibilita la obtención de información adicional de los genotipos participantes en el proceso, lo cual puede ser importante desde un punto de vista tecnológico.

Por último, y dada la importancia que la producción de aminos biógenos tiene en la calidad de los vinos, merece ser mencionado el estudio que se llevó a cabo con 90 aislados de *O. oeni*, obtenidos de las muestras tomadas en la primera vendimia, para conocer la capacidad aminobiogénica de los mismos, estudio en el que se utilizaron métodos de determinación de aminos biógenos cualitativos, cuantitativos y moleculares.

Los resultados del ensayo cualitativo, realizado en placas de agar que contenían los diferentes aminoácidos, pusieron de manifiesto que 27 de los aislados producían algún viraje en el color de las placas, aunque en muchas ocasiones éste tuviera un carácter débil. Veintiséis de ellos fueron positivos para el aminoácido histidina y uno resultó positivo para la ornitina.

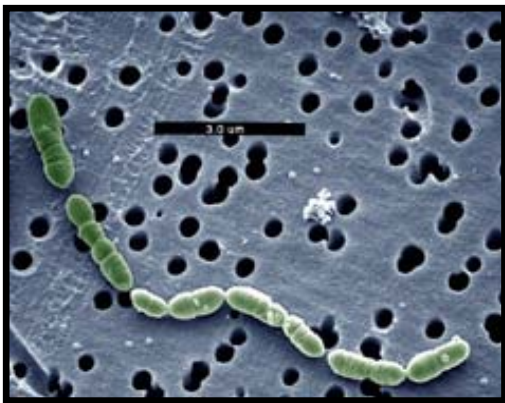
Para confirmar estos resultados, se efectuaron ensayos adicionales en los 27 aislados que habían resultados positivos, cultivándolos tanto en caldos que contenían los diferentes aminoácidos como en vino. Tras la incubación se

determinaba la concentración de aminoácidos y de aminas biógenas por cromatografía líquida (Gómez-Alonso et al., 2007). Asimismo, se realizaron reacciones de PCR específicas, siguiendo el procedimiento descrito por Marcobal et al. (2004), para confirmar la presencia en los aislados de los genes de las correspondientes descarboxilasas.

El análisis cromatográfico y las reacciones de PCR específica confirmaron la capacidad para producir histamina y putrescina de dos de los aislados -aislados J34L5 y J20L8, respectivamente- siendo la cantidad de histamina producida en vino mayor que la máxima permitida en algunos países. La cantidad de histamina producida por los restantes aislados fue prácticamente despreciable, no detectándose en ningún caso la presencia del gen de la histidina descarboxilasa (*hdc*), resultados que coinciden con los descritos por Landete et al. (2005).

Moreno-Arribas et al. (2003) también describieron la presencia de aislados “falso-positivo” para la histamina, en los ensayos de aminas biógenas efectuados en placas de agar, y más recientemente, Lucas et al. (2005) han demostrado que el gen de la histidina descarboxilasa se encuentra en un plásmido inestable y que la capacidad para producir histamina es una característica que puede perderse dependiendo de las condiciones de cultivo, lo que explicaría este hecho.

El bajo número de aislados de *O. oeni* con capacidad aminobiogénica encontrado en este estudio, permitiría afirmar que *O. oeni* no contribuye significativamente al contenido global de aminas biógenas en los vinos y que la capacidad para producir histamina, tiramina, putrescina y cadaverina no es una característica de esta especie, sino más bien una propiedad limitada a un pequeño número de cepas.



Oenococcus

5. Conclusiones finales

CONCLUSIONES FINALES

De los resultados anteriormente expuestos pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. La Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) es una técnica adecuada para el genotipado de cepas de *Oenococcus oeni*, tanto por su capacidad de discriminación intraespecífica, comparable con la de la Pulsed Field Gel electrophoresis (REA-PFGE), como por su sencillez metodológica.
2. Por el contrario, la DD-PCR mostró una escasa reproducibilidad lo que, en nuestra opinión, invalida este método para estudios de biodiversidad.
3. *O. oeni* es la especie predominante en la fermentación maloláctica de los vinos de la variedad Tempranillo, si bien también han podido identificarse, aunque en baja proporción, las especies: *L. casei*, *L. plantarum*, *L. hilgardii* y *Lc. mesenteroides*.
4. La presencia de genotipos coincidentes en muestras tomadas en diferentes vendimias y procedentes de bodegas situadas en diferentes provincias de la región, sugiere una distribución geográfica de las cepas de *O. oeni* que crecen espontáneamente en el vino y confirma la existencia de una microbiota bien adaptada no sólo a las condiciones de elaboración utilizadas en la bodega, sino también a las condiciones ecológicas de esta región.
5. Las cepas *O. oeni* C22L9 y *O. oeni* D13L3 fueron las que mostraron un mejor comportamiento en el estudio de caracterización tecnológica, siendo los vinos elaborados con la cepa C22L9 los preferidos por los catadores en el análisis sensorial.
6. La cepa C22L9 se implantó de forma satisfactoria en todas las variedades de vino (Tempranillo, Syrah, Cabernet Sauvignon y Tinto Pámpana Blanca) ensayadas, habiéndose obtenido porcentajes de implantación superiores a los de la cepa comercial.
7. En consecuencia, puede afirmarse que la cepa *O. oeni* C22L9 es una excelente candidata para ser utilizada como cultivo iniciador.

8. La técnica Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) puso de manifiesto la presencia de especies de los géneros *Gluconobacter*, *Asaia*, *Enterobacter* y *Serratia*, además de algunas de las ya observadas en las siembras en placa, en la fermentación maloláctica de los vinos de la variedad Tempranillo.
9. La comparación de los resultados obtenidos tras la siembra en placa con aquellos de la DGGE-PCR permite afirmar que tampoco las técnicas independientes de cultivar proporcionan una imagen completa de los diferentes grupos de bacterias presentes en este proceso, pero lo que, en nuestra opinión, sería necesario utilizar de forma combinada métodos dependientes e independientes de cultivo. De esta forma, se podrían determinar tanto las especies dominantes como las minoritarias lo que permitiría alcanzar tener un mejor conocimiento de la ecología bacteriana que existe en la fermentación del vino.

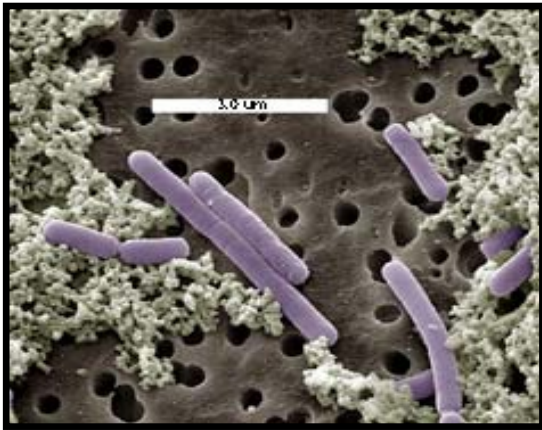
Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han permitido tener un mejor conocimiento del proceso microbiológico que ocurre en la fermentación maloláctica de los vinos de la variedad Tempranillo, del que hasta ahora existían pocos datos, a diferencia de lo que ocurre con vinos de otras denominaciones.

La cepa C22L9 seleccionada en este estudio parece tener unas excelentes propiedades para ser utilizada a escala industrial, habiéndose iniciado por ello el proceso para su patente. A estos efectos la cepa ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) denominándose *O. oeni* 7621.

La empresa multinacional Danstar Ferment A.G. ha realizado, con buenos resultados, los ensayos para conocer la viabilidad de liofilización de la misma, de gran importancia para su producción industrial, lo que permitirá realizar elaboraciones en algunas de las bodegas colaboradoras en los proyectos que nuestro grupo de investigación realiza, en la próxima vendimia. Esta empresa ha mostrado asimismo, un gran interés por la explotación comercial de la misma.

La puesta a disposición de las bodegas de cepas autóctonas seleccionadas en base a criterios enológicos adecuados a las exigencias del mercado actual, reportará importantes beneficios a la industria del sector. Por un lado, permitirá un control eficiente de la fermentación maloláctica evitando riesgos innecesarios que siempre implican un coste económico, y por otro, permitirá la obtención de vinos higiénicos de calidad con características enológicas propias.

El interés mostrado por la empresa Danstar Ferment A.G., especializada en la producción industrial de cultivos seleccionados de levaduras y bacterias de uso enológico y líder del sector, es un buen indicador de la necesidad que el sector vitivinícola tiene de disponer de estos cultivos iniciadores.



Lactobacillus

6. Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Agouridis, N., Kopsahelis, N., Plessas, S., Koutinas, A.A. y Kanellaki, M.** 2008. *Oenococcus oeni* cells immobilized on delignified cellulosic material for malolactic fermentation of wine. *Bioresour. Technol.* 99 (18), 9017-9020.
- Alberto, M.R., Farias, M.E. y Manca de Nadra, M.C.** 2001. Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 19 (9), 4359-4363.
- Alexandre, H., Costello, P.J., Remize, F., Guzzo, J. y Guilloux-Benatier, M.** 2004. *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *Int. J. Food Microbiol.* 93 (2), 141-154.
- Allouch, P., Sockaligum, G.D., Pina, P., Bouhedja, E.W. y Manfart, M.** 1998. Utilisation de la spectrometrie infrarouge Transformée de Fourier en microbiologie. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 13, 18-20.
- Aquilanti, L., Dell'Aquila, L., Zannini, E., Zochetti, A. y Clementi, F.** 2006. Resident lactic acid bacteria in raw milk Canestrato Pugliese cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 161-167.
- Aredes Fernandez, P.A., Saguir, F.M. y Manca de Nadra, M.C.** 2004. Effect of dipeptides on the growth of *Oenococcus oeni* in synthetic medium deprived of amino acids. *Curr. Microbiol.* 49, 361-365.
- Axelsson, L.** 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects. Salminen, S. y Von Wright, A. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, Based, Hong Kong. 2nd Edition, pp. 1-72.
- Bae, S., Fleet, G.H. y Heard, G.M.** 2006. Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *J. Appl. Microbiol.* 100 (4), 712-725.
- Baird-Paker, A.C.** 1980. Organic acids. En: Microbial Ecology of Foods, Silliker, J.H. (Ed.), Academic Press, New York, pp. 126-135.
- Bartowsky, E.J.** 2009. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 149-156.
- Bauer, R., Nel, H.A. y Dicks, L.M.T.** 2003. Pediocin PD-1 as a method to control growth of *Oenococcus oeni* in wine. *Am. J. Enol. Viticult.* 54, 86-91.

- Bauza, T., Blaise, A., Mestres, J.P., Teissedre, P.L., Cabanis, J.C., Kanny G. y Moneret-Vautrin, A.** 1995. Les amines biogènes du vin. Métabolisme et toxicité. Bulletin OIV 767-776, 42-67.
- Beekes, M., Lasch, P. y Naumann, D.** 2007. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. *Vet. Microbiol.* 123, 305-319.
- Beelman, R.B. y Kunkee, R.E.** 1985. Inducing simultaneous malolactic–alcoholic fermentation in red table wines. In: Malolactic Fermentation, Lee, T.H. (Ed.), Australian Wine Research Institute, Glen Osmond, South Australia, pp. 97-112.
- Beneduce, L., Spano, G., Vernile, A., Tarantino, D. y Massa, S.** 2004. Molecular characterization of lactic acid populations associate with wine spoilage. *J. Basic Microbiol.* 44 (1), 10-16.
- Berlec, A. y Strukelj, B.** 2009. Novel applications of recombinant lactic acid bacteria in therapy and in metabolic engineering. *Recent Pat. Biotechnol.* 3 (2), 77-87.
- Beutling, D.** 1996. Biogenic amines in nutrition. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 59-67.
- Blaiotta, G., Moschetti, G., Simeoli, E., Andolfi, R., Villani, F. y Coppola, S.** 2001. Monitoring lactic acid bacteria strains during ‘Cacioricotta’ cheese production by restriction endonuclease analysis and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Dairy Res.* 68, 139-144.
- Blom, H.** 1983. Partial characterization of a thermostable anthocyanin- β -glycosidase from *Aspergillus niger*. *Food Chem.* 12, 197-204.
- Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Carrau, F. y Dellacassa, E.** 2002. Effect of β -Glycosidase Activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tannat wine during malolactic fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2344-2349.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. y Sorokin, A.** 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL 1403. *Genome Res.* 11, 731-753.
- Bordons, A.** 2001. Bioquímica de la fermentación maloláctica y factores que afectan su desarrollo. Abstract de las Jornadas de las bacterias lácticas en enología del INCAVI (Barcelona).
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. y Kunkee, R.E.** 1996. Principles and practices of winemaking. The Chapman and Hall Enology Library, Maryland.

- Bourgeois, J. y Larpent, J.** 1989. Les fermentations alimentaire. En: Microbiologie Alimentaire. Vol. II. TEC and DOC. Lavoisier, Paris.
- Bover-Cid, S. y Holzapfel, W.H.** 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 53, 33-41.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M.C.** 2000. Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of fuet sausages. *J. Food Prot.* 66, 185-189.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M.C.** 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 66,185-189.
- Bruno, M.E., Kaiser, A. y Montville, T.J.** 1992. Depletion of the proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2255-2259.
- Buckenhüskes, H.J.** 1990. Processing and Quality of Foods. Vol 2. Zeuthen, P. (Ed.), Elsevier Applied Science, London & New York, pp. 2162-2187.
- Buckenhüskes, H.J.** 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 253-272.
- Cappello, M.S., Stefani, D., Grieco, F., Logrieco, A. y Zapparoli G.** 2008. Genotyping by Amplified Fragment Length Polymorphism and malate metabolism performances of indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from *Primitivo* wine. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 241-245.
- Carre, E.** 1982. Thèse de Doctorat, Institut d'œnologie, Université de Bordeaux II.
- Carrete, R., Vidal, M.T., Bordons, A. y Constanti, M.** 2002. Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol. Lett.* 211 (2), 155-159.
- Castino, M., Usseglio-Tomasset, L. y Gandini, A.** 1975. Factors which affect the spontaneous initiation of the malo-lactic fermentation in wines. The possibility on transmission by inoculation and its effect on organoleptic qualities. In: Lactic acid bacteria in beverages and food. Carr, J.G., Cutting, C.V. y Whiting, G.C. (Eds.), Academic Press, London, pp. 139-148.
- Cavin, J.F., Andioc, V., Etievant, P.X. y Divies, C.** 1993. Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 76-80.
- Cavin, J.F., Gerbaux, V., Guilloux, M. y Leroy, M.J.** 1989. Pour une bonne fermentation malolactique, ensemercer. *Viti.* 138, 61-62.

- Charpentie, Y.** 1954. Contribution à l'étude biochimique des facteurs de l'acidité des vins. Thèse Ingenieur Docteur. Université Bordeaux.
- Choi, I.K., Jung, S.H., Kim, B.J., Park, S.Y., Kim, J. y Han, H.U.** 2003. Novel *Leuconostoc citreum* starter culture system for the fermentation of kimchi, a fermented cabbage product. *Anton. Leeuw.* 84 (4), 247-253.
- Clarke, O.** 2001. Encyclopedia of Grapes. Harcourt Books, pp. 272.
- Collado, M.C., Delgado, S., Maldonado, A. y Rodríguez, J.M.** 2009. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 48 (5), 523-528.
- Collins, M.D., Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S. y Williams, A.M.** 1989. 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov. sp. nov. *J. Appl. Bacteriol.* 67, 453-460.
- Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Ferusu, S. y Jones, D.** 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, y some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 310-316.
- Collins, M.D., Williams, A.M. y Wallbanks, S.** 1990. The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov.. *FEMS Microbiol. Lett.* 70, 255-262.
- Coppola, S., Fusco, V., Andolfi, R., Aponte, M., Blaiotta, G., Ercolini, D. y Moschetti, G.** 2006. Evaluation of microbial diversity during the manufacture of Fior di Latte di Agerola, a traditional raw milk pasta-filata cheese of the Naples area. *J. Dairy Res.* 29, 1-9.
- Costantini, A., Cersosimo, M., Del Prete, V. y García-Moruno, E.** 2006. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: screening by PCR, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must. *J. Food Prot.* 69, 391-396.
- Coton, M., Coton, E., Lucas, P. y Lonvaud-Funel, A.** 2004. Identification of the gene encoding a putative decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiol.* 21, 125-130.

- Coucheney F., Desroche N., Bou M., Tourdou-Maréchal R., Dulau L. y Guzzo J.** 2005. A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 463-470.
- Cronin, T., Ziino, M., Condurso, C., McSweeney, P.L., Mills, S., Ross, R.P. y Stanton, C.** 2007. A survey of the microbial and chemical composition of seven semi-ripened Provolone dei Nebrodi Sicilian cheeses. *J. Appl. Microbiol.* 103 (4), 1128-1139.
- Daeschel, M.A.** 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 7, 91-98.
- Daeschel, M.A.** 1992. Bacteriocins of lactic acid bacteria. En: Food Biopreservatives of Microbial Origin. Ray, B. y Daeschel, M. (Eds.), CRC Press, Inc., Boca Ratón, Florida, pp. 323-345.
- Davis, C.R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T.H. y Fleet, G.H.** 1985. Practical implications of malolactic fermentation: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 290-301.
- Decallone, J., Delmée, M., Wauthoz, P., El Lioni, M. y Lambert, P.** 1991. A rapid procedure for the identification of lactic acid bacteria based on the gas chromatographic analysis of the cellular fatty acids. *J. Food Prot.* 54, 217-224.
- De Jong, A., van Hijum, S.A.F.T., Bijlsma, J.J.E., Kok, J. y Kuipers, O.P.** 2006. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Res.* 34, 273-279.
- Delbès, C., Ali-Mandjee, L. y Montel, M.C.** 2007. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (6), 1882-1891.
- Delteil, D.** 2001. Effets de différents moments d'inoculation en bactéries lactiques sur les profils des vins rouges méditerranéens. Extrait de *Congress Proceedings, 26th OIV World Congress*, Adelaide, Australia.
- Desportes, C., Charpentier, M., Duteurtre, B., Maujean, A. y Duchiron, F.** 2000. Liquid chromatographic fractionation of small peptides from wine. *J. Chromatogr. A.* 893, 281-291.
- De Vos, W.M. y Vaughan, E.E.** 1994. Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 217-237.

- De Vuyst, L. y Vandamme, E.J.** 1994 Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications. De Vuyst, L. y Vandamme, E.J. (Eds.), Blackie Academic & Professional, London.
- Diep, D.B. y Nes, I.F.** 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug. Targets* 3, 107-122.
- du Plessis, H.W., Dicks, L.M.T., Pretorius, I.S., Lambrechts, M.G. y du Toit, M.** 2004. Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 19-29.
- Dupont, C., Sivadon-Tardy, V., Bille, E., Dauphin, B., Beretti, J., Alvarez, A., Degand, N., Ferroni, A., Rottman, M., Herrmann, J., Nassif, X., Ronco, E. y Carbonnelle, E.** 2009. Identification of Clinical Coagulase Negative Staphylococci Isolated in Microbiology Laboratories by MALDI-TOF Mass Spectrometry and two automates. *Clin. Microbiol. Infect.* doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03036.x.
- Duthoit, F., Godon, J.J. y Montel, M.C.** 2003. Bacterial community dynamics during production of Registered Designation of Origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (7), 3840-3848.
- Du Toit, W.J. y Pretorius, I.J.** 2002. The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Ann. Microbiol.* 52, 155-179.
- Dykes, G.A., Cloete, T.E. y von Holy, A.** 1995. Taxonomy of lactic acid bacteria associated with vacuum-packaged processed meat spoilage by multivariate analysis of cellular fatty acids. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 89-100.
- Edwards, C.G. y Beelman, R.B.** 1987. Inhibition of the malolactic bacterium, *Leuconostoc oenos* (PSU-1), by decanoic acid and subsequent removal of the inhibition of the yeast ghosts. *Am. J. Enol. Vitic.* 38, 239-242.
- Edwards, C.G., Beelman, R.B. Bartley, C.E. y McConnell, A.** 1990. Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 48-56.
- Edwards, C.G. y Jensen, K.A.** 1992. Occurrence and characterization of lactic acid bacteria from Washington State wines: *Pediococcus* spp. *Am. J. Enol. Vitic.* 43 (3), 233-238.

- Edwards, C.G., Powers, J.R., Jensen, K.A., Weller, K.M. y Peterson, J.C.** 1993. *Lactobacillus* spp. from Washington State wines: isolation and characterization. *J. Food Sci.* 58, 453-458.
- Egli, C.M., Edinger, W.D., Mittrakul, C.M. y Henick-Kling, T.** 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85, 779-789.
- Ehrmann, M., Ludwig, W. y Schleifer, K.H.** 1994. Reverse dot blot hybridization: a useful method for the direct identification of lactic acid bacteria in fermented food. *FEMS Microbiol. Lett.* 117, 143-149.
- Eijsink, V.G.H., Axelsson, L., Diep Dzung, B., Håvarstein, L.S., Holo, H. y Nes, I.F.** 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Anton. Leeuw.* 81, 639-654.
- Eklund, T.** 1984. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 2423-2429.
- Endo, A. y Okada, S.** 2008. Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2195-2205.
- Ercolini, D.** 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods* 56, 297-314.
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G. y Coppola, S.** 2001. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Syst. Appl. Microbiol.* 24 (4), 610-617.
- Farber, J.M.** 1996. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J. Food. Protect.* 59, 1091-1101.
- Fayed, E.O., Sultan, N., Yassein, N.I. y Shehata, A.E.** 1986. The effect of lyophilization on viability and activity of LAB cultivated in whey treated with certain proteolytic enzymes. *Egypt. J. Food Sci.* 14, 313-322.
- Flanzy, C.** 1998. Oenologie. Fondements scientifiques et technologiques. Tec. & Doc. Lavoisier (Paris).

- Fleet, G.H. y Heard, G.M.** 1993. Yeast growth during fermentation. In: Wine Microbiology and Biotechnology. Fleet, G.H. (Ed.), Harwood Academic Publishers, Switzerland. pp. 27-54.
- Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S. y Ribéreau-Gayon, P.** 1984. Evolution of yeast and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1034-1038.
- Fleming, H.P., McFeeters, R.F. y Daeschel, M.A.** 1985. The lactobacilli, pediococci and leuconostocs: vegetable products. En: Bacterial Starter Cultures for Foods. Gilliland, S.E. (Ed.), CRC Press, Florida.
- Fontana, C., Sandro Cocconcetti, P. y Vignolo, G.** 2005. Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 103 (2), 131-42.
- Formisyn, P., Vaillant, H., Laintreibeck, F. y Bourgois, J.** 1997. Development of an enzymatic reactor for initiating malolactic fermentation in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 345-351.
- Fox, P.F., Lucey, J.A. y Cogan, T.M.** 1990. Glicolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29, 237-253.
- Fox, P.F. y Wallace, J.M.** 1997. Formation of flavor compounds in cheese. *Adv. Appl. Microbiol.* 43, 17-85.
- Gallander, J.F.** 1979. Effect of time of bacterial inoculation on the stimulation of malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 30, 157-159.
- Gallego, C.** 2005. El vino uva a uva: Enología de las variedades de uva y su madridaje. Everest (Ed.), León.
- Gancheva, A., Pot, B., Vanhonacker, K., Hoste, B. y Kersters, K.** 1999. A polyphasic approach towards the identification of strains belonging to *Lactobacillus acidophilus* and related species. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 573-585.
- García, M.J., Zúñiga, M. y Uruburu, F.** 1992. Revisión: El metabolismo y el control de las bacterias lácticas en el vino. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* 32 (3), 233-268.
- Garriga, M., Marcos, B., Martín, B., Veciana-Nogués, M.T., Bover-Cid, S., Hugas, M. y Aymerich, T.** 2005. Starter cultures and high-pressure processing to improve the hygiene and safety of slightly fermented sausages. *J. Food Prot.* 68 (11), 2341-2348.

- Gerbaux, V. y Monamy, C.** 2000. Les amines biogènes dans les vins de Bourgogne. 1^a partie: teneurs, origine et maîtrise dans les vins. *Rev. Franc. d'Oenol.* 183, 25-28.
- Giannino, M.L., Marzotto, M., Dellaglio, F. y Feligini, M.** 2009. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* 130, 188-195.
- Gilarova, R., Voldrich, M., Demnerova, K., Cerovsky, M. y Dobias, J.** 1994. Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 315-319.
- Giraffa, G.** 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 251-260.
- Gómez-Alegría, E., López, I., Ruiz, J.I., Sáenz, J., Fernández, E., Zarazoga, M., Dizy, M., Torres, C. y Ruiz-Larrea, F.** 2004. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol. Lett.* 230, 53-61.
- Gómez-Alonso, S., Hermosín, I. y García-Romero, E.** 2007. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ion as aminoenones derivatives in wine and beer samples. *J. Agric. Food Chem.* 55, 608-613.
- González, M.C., Colomo, B., Suárez Lepe, J.A. y Palacios, A.T.** 1998. Inducción de la fermentación maloláctica en vinos de la D.O. Navarra (España). Abstract de la Jornada Les entretiens scientifiques. Lallemand. The management of malolactic fermentation and quality of wine (Verona).
- Goodacre, R., Timmins, E.M., Rooney, P.J., Rowland, J.J. y Kell, D.B.** 1996. Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. *FEMS Microbiol. Lett.* 140, 233-239.
- Grimaldi, A., Bartowsky, E. y Jiranek, V.** 2005a. A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 233-244.
- Grimaldi, A., Bartowsky, E. y Jiranek, V.** 2005b. Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1061-1069.
- Guarner, F. y Schaafsma, G.J.** 1998. Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 39 (3), 237-238.

- Guerrini S., Bastianini A., Blaiotta G., Granchi L., Moschetti G., Coppola P. y Vincenzini M.** 2003. Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. *Int. J. Food. Microbiol.* 83, 1-14.
- Guerrini, S., Mangani, S., Granchi, L. y Vincenzini, M.** 2002. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Curr. Microbiol.* 44, 374-378.
- Hakki, E.E. y Akkaya, M.S.** 2001. RT-PCR amplification of a *Rhizopus oryzae* lactate dehydrogenase gene fragment. *Enzyme Microbial. Technol.* 28, 259-264.
- Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L. y Holzapfel, W.** 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.* 5 (2), 42-49.
- Heard, G.M. y Fleet, G.H.** 1986. Occurrence and growth of yeast species during fermentation of some Australian wines. *Food Technol. Aust.* 38, 22-25.
- Henick-Kling, T. y Acree, T.E.** 1998. Modification of wine flavour by malolactic fermentation. The Management of Malolactic Fermentation of Wine. A Symposium. Lallemand Italia (Ed.), Paragraphic, Toulouse, France, pp. 17-22.
- Henick-Kling, T., Sandinem W.E. y Heatherbell, D.A.** 1989. Evaluation of malolactic bacteria isolated from Oregon wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2010-2016.
- Heyman, M. y Ménard, S.** 2002. Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1151-1165.
- Hidalgo, J.** 2003. Tratado de Enología. Tomos I y II. Mundi-Prensa (Ed.), Madrid.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A. y Guillamón, J.M.** 2007. Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR. *FEMS Yeast Res.* 7 (8), 1340-1349.
- Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S. y Nes, I.F.** 2001. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiol.* 147, 643-651.
- Holt, J.H., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. y Williams, S.T.** 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland. 9th Edition.
- Hong, Y., García, M., Levisohn, S., Savelkoul, P., Leiting, V., Lysnyansky, I., Ley, D.H. y Kleven, S.H.** 2005. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using Amplified Fragment Length Polymorphism and other DNA-based typing methods. *Avian Dis.* 49, 43-49.

- Huang, H.T.** 1955. Decolorization of anthocyanins by fungal enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 3, 141-146.
- Huch Née Kostinek, M., Hanak, A., Specht, I., Dortu, C.M., Thonart, P., Mbugua, S., Holzapfel, W.H., Hertel, C. y Franz, C.M.** 2008. Use of *Lactobacillus* strains to start cassava fermentations for Gari production. *Int. J. Food Microbiol.* 128 (2), 258-267.
- Izquierdo, P.M., García, E., Gómez, S. y Palop, M.LI.** 2008. Changes in the aromatic composition of Tempranillo wines during spontaneous malolactic fermentation. *J. Food Compost. Anal.* 21, 724-730.
- Izquierdo, P.M., García, E., Martínez, J. y Chacón, J.L.** 2004. Selection of lactic bacteria to induce malolactic fermentation in cencibel red wine of the cv. Cencibel. *Vitis* 43, 149-153.
- Izuagbe, Y.S., Dohman, T.P., Sandine, W.E. y Heatherbell, D.A.** 1985. Characterization of *Leuconostoc oenos* isolated from Oregon wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 680-684.
- Jay, J.M.** 1986. Modern food microbiology. Van Nostrand Reinhold, Nueva York.
- Jussier, D., Dubé Morneau, A. y Mira de Orduña, R.** 2006. Effect of simultaneous inoculation with yeast and bacteria on fermentation kinetics and key wine parameters of cool-climate chardonnay. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (1), 221-227.
- Kahala, M., Mäki, M., Lehtovaara, A., Tapanainen, J.M., Katiska, R., Juuruskorpi, M., Juhola, J. y Joutsjoki, V.** 2008. Characterization of starter lactic acid bacteria from the Finnish fermented milk product villi. *J. Appl. Microbiol.* 105 (6), 1929-1938.
- Kalmar, Z.P.** 1995. Thèse de Doctorat, Institut d'œnologie, Université de Bordeaux II.
- Kandler, O.** 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw.* 49, 209-224.
- Kandler, O. y Weiss, N.** 1986. Regular, nonsporing Gram-positive rods. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.C. (Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1208-1234.
- Kelly, W.J., Huang, C.M. y Asmundson, R.V.** 1993. Comparision of *Leuconostoc oenos* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3969-3972.

- King, S.W. y Beelman, R.B.** 1986. Metabolic interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 53-60.
- Kirschner, C., Maquelin, K., Pina, P., Ngo Thi, N.A., Choo-Smith, P., Sockalingum, G.D., Sandt, C., Ami, D., Orsini, F., Doglia, S.M., Allouch, P., Mainfait, M., Puppels, G.J. y Naumann, D.** 2001. Classification and Identification of Enterococci: a Comparative Phenotypic, Genotypic, and Vibrational Spectroscopic Study. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1763-1770.
- Klaenhammer, T.R.** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337-349.
- Knoll, C., Divol, B. y du Toit, M.** 2008. Genetic screening of lactic acid bacteria of oenological origin for bacteriocin-encoding genes. *Food Microbiol.* 25, 983-991.
- Konings, W.N., Kok, J., Kuipers, O.P. y Poolman, B.** 2000. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Curr. Opinion Microbiol.* 3, 276-282.
- Krieger, S.** 2002. Starter cultures for the malolactic fermentation time of inoculation. In: Verlag, T.S. (Ed.), Proceedings of the 13th International Oenology Symposium; 9-12 June 2002. Montpellier, France, International Association of Oenology, Management and Wine Marketing, 77-91.
- Kunkee, R.E.** 1991. Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making. *FEMS Microbiol. Lett.* 88, 55-71.
- Kwaik, Y.A. y Pederson, L.L.** 1996. The use of differential display-PCR to isolate and characterize a *Legionella pneumophila* locus induced during the intracellular infection of macrophages. *Mol. Microbiol.* 21, 543-556.
- Lafon-Lafourcade, S.** 1983. Wine and brandy. En: Biotechnology: Food and Feed Production with Microorganisms. Vol. 5. Rehm, H.J. y Reed, G. (Eds.), Verlag Chemie, Weinheim, pp. 81-163.
- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., Lonvaud-Funel, A. y Ribéreau-Gayon, P.** 1983a. Induction de la fermentation malolactique des vins par inoculation d'une biomasse industrielle congelée de *L. Oenos* après réactivation. *Conn. Vigne Vin* 17, 55-71.
- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E. y Ribéreau-Gayon, P.** 1983b. Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 874-880.

- Lafon-Lafourcade, S. y Peynaud, E.** 1974. Sur l'action antibacterienne de l'annhydride sulfureux sous forme libre et sous forme combinée. *Conn. Vigne Vin* 8, 187-203.
- Landete, J.M., Ferrer, S. y Pardo, I.** 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control* 18, 1569-1574.
- Landete, J.M., Ferrer, S., Polo, L. y Pardo, I.** 2005. Biogenic amines in wine from three Spanish regions. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1119-1124.
- Larpent, J.P.** 1995. Las bacterias lácticas. En: Microbiología alimentaria. Ed. Acribia, S.A. Vol. 2, pp. 3-17.
- Lartigue, M.F., Héry-Arnaud, G., Haguenoer, E., Domelier, A.S., Schmit, P.O., van der Mee-Marquet, N., Lanotte, P., Mereghetti, L., Kostrzewa, M. y Quentin, R.** 2009. Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 47 (7), 2284-2287.
- Law, B.A. y Kolstad, J.** 1983. Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw.* 49, 225-245.
- Lay, J.O.** 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom Rev.* 20 (4), 172-194.
- Lechiancole T., Blaiotta G., Messina D., Fusco V., Villani F. y Salzano F.** 2006. Evaluation of intra-specific diversities in *Oenococcus oeni* through analysis of genomic and expressed DNA. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 375-381.
- Leclerc, D. y Asselin, A.** 1989. Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Can. J. Microbiol.* 35, 749-753.
- Lefier, D., Lamprell, H. y Mazerolles, G.** 2000. Evolution of *Lactococcus* strains during ripening in Brie cheese using Fourier transform infrared spectroscopy. *INRA* 80, 247-254.
- Leisner, J.J., Greer, G.G. y Stiles, M.E.** 1996. Control of beef spoilage by a sulphide-producing *Lactobacillus sake* strain with bacteriocinogenic *Leuconostoc gelidum* UAL187 during anaerobic storage at 2 °C. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2610-2614.
- Leroy, F. y De Vuyst, L.** 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food sci. technol.* 15, 67-78.

- Lindgren, S.E. y Dobrogosz, W.J.** 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87, 149-164.
- Liu, S.Q.** 2002. Malolactic fermentation in wine beyond deacidification. *J. Appl. Microbiol.* 92, 589-601.
- Liu, J.W.R. y Gallander, J.F.** 1983. Effect of pH and sulfur dioxide on the rate of malolactic fermentation in red table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 34, 44-46.
- Lonvaud-Funel, A.** 1995. Microbiology of malolactic fermentation: Molecular aspects. *FEMS Microbiol. Lett.* 126, 209-214.
- Lonvaud-Funel, A.** 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Anton. Leeuw. Int. J.* 76, 317-331.
- Lonvaud-Funel, A. y Joyeux, A.** 1993. Antagonism between lactic acid bacteria of wines: Inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*. *Food Microbiol.* 10, 411-419.
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A. y Desens, C.** 1988. The inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. *J. Food Sci. Agric.* 44, 183-191.
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A. y Ledoux, O.** 1991. Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes. *J. Appl. Bacteriol.* 71, 501-508.
- Lopez, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Phister, T., Marshall, M., VanderGheynst, J. y Mills, D.A.** 2003. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6801-6807.
- Lopez, I., Tenorio, C., Zarazaga, M., Dizy, M, Torres, C. y Ruiz-Larrea, F.** 2007. Evidence of mixed wild populations of *Oenococcus oeni* strains during wine spontaneous malolactic fermentations. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 215-223.
- Lortal, S., Valence, F., Bizet, C. y Maubois, J.L.** 1997. Electrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases, a new tool for bacterial species identification: application to 10 *Lactobacillus* species. *Res. Microbiol.* 148, 461-474.
- Lucas, P., Claisse, O. y Lonvaud-Funel, A.** 2008. High frequency of histamine-producing bacteria in the enological environment and instability of the histidine decarboxylase production phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 811-817.

- Lucas, P., Wolken, W.A., Claisse, O., Lolkema, J.S. y Lonvaud-Funel, A. 2005. Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1417-1424.
- Maicas, S. 2001. The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 35-39.
- Maijala, R. 1993. Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS broth and modified decarboxylation agar. *Lett. Appl. Microbiol.* 17, 40-43.
- Man, J.C., Rogosa, M. y Sharpe, M.E. 1960. A medium for cultivation of *Lactobacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130-135.
- Manca de Nadra, M.C., Farias, M.E., Moreno-Arribas, M.V., Pueyo, E. y Polo, M.C. 1997. Proteolytic activity of *Leuconostoc oenos*: effect on proteins and polypeptides from white wine. *FEMS Microbiol. Lett.* 150, 135-139.
- Mañes-Lázaro, R., Ferrer, S., Rosselló-Mora, R. y Pardo, I. 2008. *Lactobacillus uvarum* sp. nov. A new lactic acid bacterium isolated from Spanish Bobal grape must. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 425-433.
- Marcobal, A., Rivas, B., Moreno-Arribas, M.V. y Muñoz, R. 2004. Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiol. Lett.* 239, 213-220.
- Marcobal, A., Rivas, B., Moreno-Arribas, M.V. y Muñoz, R. 2005. Multiplex PCR method for the simultaneous detection of histamine-, tyramine-, and putrescine-producing lactic acid bacteria in foods. *J. Food Prot.* 68, 874-878.
- Martín, R., Delgado, S., Maldonado, A., Jiménez, E., Olivares, M., Fernández, L., Sobrino, O.J. y Rodríguez, J.M. 2009. Isolation of lactobacilli from sow milk and evaluation of their probiotic potential. *J. Dairy Res.* doi:10.1017/S0022029909990124.
- Martineau, B. y Henick-Kling, T. 1995. Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 526-536.
- Martínez, L., Cavagnaro, P., Masuelli, R. y Rodríguez, J. 2003. Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. *Electron. J. Biotechnol.* 6 (3), 244-253.
- Matthews, A., Grimaldi, A., Walker, M., Bartowsky, E., Grbin, P. y Jiranek, V. 2004. Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5715-5731.

- McDonald, L.C., Fleming, H.P. y Hassan, H.M.** 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2120-2124.
- Meroth, C.B., Walter, J., Hertel, C., Brandt, M.J. y Hammes, W.P.** 2003. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 475-482.
- Miambi, E., Guyot, J.P. y Ampe, F.** 2003. Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 111-120.
- Mohamadzadeh, M., Duong, T., Hoover, T. y Klaenhammer, T.R.** 2008. Targeting mucosal dendritic cells with microbial antigens from probiotic lactic acid bacteria. *Expert Rev. Vaccines* 7 (2), 163-174.
- Montaño, A., De Castro, A. y Rejano, L.** 1992. Transformaciones bioquímicas durante la fermentación de productos vegetales. *Grasas y Aceites* 43, 352-360.
- Moreno-Arribas, V., Polo, M.C., Jorganes, F. y Muñoz, R.** 2003. Screening of biogenic amines production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 117-123.
- Moreno-Arribas, V., Torlois, S., Joyeux, A., Bertrand, A. y Lonvaud-Funel, A.** 2000. Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *J. Appl. Microbiol.* 88, 584-593.
- Nannelli, F., Claisse, O., Gindreau, E., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A. y Lucas, P.M.** 2008. Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Lett. Appl. Microbiol.* 47 (6), 594-599.
- Navarro, L., Rojo-Bezares, B., Saenz, Y., Díez, L. y Zarazaga, 2008.** Comparative study of the *pln* locus of the quorum-sensing regulated bacteriocin producing *L. plantarum* J51 strain. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 390-394.
- Nel, H.A., Bauer, R., Wolfaardt, G.M. y Dicks, L.M.T.** 2002. Effect of bacteriocins pediocin PD-1, plantaricin 423, and nisin on biofilms of *Oenococcus oeni* on a stainless steel surface. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 191-196.

- Nielsen, J.C., Prahl, C. y Lonvaud-Funel, A.** 1996. Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-dried *Leuconostoc oenos* cultures. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 42-48.
- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J.M., Palop, L. y Cabezas, L.** 2009. Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in processing of artisanal Manchego cheese. *J. Appl. Microbiol.* 107 (5), 1505-1517.
- Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M.T. y Vidal-Carou, M.C.** 2000. Biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5117-5123.
- Ochoa, S., Salles, J.B.V. y Ortiz, P.J.** 1950. Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. III. Enzymatic synthesis of malic acid by reductive carboxylation of pyruvic acid. *J. Biol. Chem.* 187, 863-874.
- Oddone, G.M., Mills, D.A. y Block, D.E.** 2009. A dynamic, genome-scale flux model of *Lactococcus lactis* to increase specific recombinant protein expression. *Metab. Eng.* 11, 367-381.
- Ogier, J.C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P. y Delacroix-Buchet, A.** 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3691-3701.
- Orla-Jensen, S.** 1919. The lactic acid bacteria. Anhr. Fred. Host and Son. Copenhagen.
- Osborne, J.P., Mira de Orduña, R., Pilone, G.J. y Liu, S.Q.** 2000. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 191, 51-55.
- Ouadghiri, M., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Naser, S., Gevers, D., Lefebvre, K., Swings J. y Amar, M.** 2008. Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk "Iben". *J. Appl. Microbiol.* 106, 486-495.
- Ouwehand, A.C.** 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: Lactic acid bacteria. Microbiology and Functional aspects. Salminen, S. y Von Wright, A. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, USA. 2nd Edition, pp. 139-159.
- Parés, R. y Juárez, A.** 1997. Bioquímica de los microorganismos. Ed. Reverté, S.A.

- Pérez Pulido, R., Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas, R., Martínez, M. y Gálvez, A.** 2005. Microbiological study of lactic acid fermentation of caper berries by molecular and culture-dependent methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7872-7879.
- Persing, D.H.** 1993. In vitro nucleic acid amplification techniques. En: Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. Persing, D.H. Smith, T.F. Tenover, F.C. y White, T.J. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D. C. USA, pp. 51-87.
- Peynaud, E.** 1993. Enología práctica. Conocimiento y elaboración del vino. Mundi-Prensa (Ed.), Madrid.
- Piraino, P., Ricciardi, A., Salzano, G., Zotta, T. y Parente, E.** 2006. Use of unsupervised and supervised artificial neural networks for the identification of lactic acid bacteria on the basis of SDS-PAGE patterns of whole cell proteins. *J. Microbiol. Methods* 66 (2), 336-346.
- Preisner, O., Lopes, J.A., Guiomar, R., Machado, J. y Menezes, J.C.** 2007. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in bacteriology: towards a reference method for bacteria discrimination. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1739-1748.
- Pripis-Nicolau, L., De Revel, G., Bertrand, A. y Lonvaud-Funel, A.** 2004. Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* 96, 1176-1184.
- Querol, A., Bario, E. y Ramón, D.** 1994. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 21, 315-323.
- Querol, A., Jiménez, M. y Huerta, T.** 1990. A study on microbiological and enological parameters during fermentation musts from poor and normal grape-harvest in the region of Alicante (Spain). *J. Food Sci.* 55, 114-122.
- Radler, F.** 1975. The metabolism of organic acids by lactic acid bacteria. En: Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food. Carr, L.G., Cutting, C.V. y Whiting, G.C. (Eds.), Academic Press, London.
- Radler, F., Schütz, M. y Doelle, H.W.** 1970. Die beim abba von L-äpfelsäure durch milchsäurebakterien entstehenden isomeren der milchsäure. *Naturwiss.* 57, 672-675.

- Reguant C. y Bordons A.** 2003. Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 95, 344-353.
- Reguant, C., Carreté, R., Constantí, M. y Bordons, A.** 2005a. Population dynamics of *Oenococcus oeni* strains in a new winery and the effect of SO₂ and yeast strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 246, 111-117.
- Reguant, C., Carreté, R., Ferrer, N. y Bordons, A.** 2005b. Molecular analysis of *Oenococcus oeni* population dynamics and the effect of aeration and temperature during alcoholic fermentation on malolactic fermentation. *Int. J. Food Sci. Technol.* 40, 451-459.
- Rementzis, J. y Samelis, J.** 1996. Rapid GC analysis of cellular fatty acids for characterizing *Lactobacillus sake* and *Lact. curvatus* strains of meat origin. *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 379-384.
- Remize, F., Augagneur, Y., Guilloux-Benatier, M. y Guzzo, J.** 2005. Effect of nitrogen limitation and nature of the feed upon *Oenococcus oeni* metabolism and extracellular protein production. *J. Appl. Microbiol.* 98, 652-661.
- Remize, F., Gaudin, A., Kong, Y., Alexandre, H., Krieger, S. y Guilloux-Benatier, M.** 2006. *Oenococcus oeni* preferente for peptides: qualitative and quantitative analysis of nitrogen assimilation. *Arch. Microbiol.* 185, 459-469.
- Renouf, V., Claisse, O. y Lonvaud-Funel, A.** 2005. Numeration, identification and understanding of microbial biofilm on grape berry surface. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 316-327.
- Renouf, V., Claisse, O. y Lonvaud-Funel, A.** 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 149-164.
- Renouf, V., Claisse, O., Miot-Sertier, C. y Lonvaud-Funel, A.** 2006. Lactic acid bacteria evolution during winemaking: Use of *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis. *Food Microbiol.* 23, 136-145.
- Ribéreau-Gayon, P.** 1985. New developments in wine microbiology. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 1-10.
- Ribéreau-Gayon, P.** 2000. Handbook of enology. Wiley, Chichester.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. y Lonvaud-Funel, A.** 1998. Traité d'OEnologie I. Microbiologie du vin et vinifications. Dunod (Ed.), Paris.

- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. y Lonvaud-Funel, A.** 2000a. Handbook of Enology: the Microbiology of Wine and Vinifications. Wiley & Chichester.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. y Lonvaud-Funel, A.** 2003. Tratado de enología. Tomo I: Microbiología del vino. Vinificaciones. Hemisferio Sur (Ed.), Buenos Aires.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. y Dubourdieu, D.** 2000b. In Handbook of Enology. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Wiley, Chichester, UK, pp 140.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P. y Sudraud, P.** 1975. Traité d'Oenologie. Sciences et Techniques du vin. Vol. 2. Dunod (Ed.), Paris.
- Rico, A., Ortiz-Barredo, A., Ritter, E. y Murillo, J.** 2004. Genetic characterization of *Erwinia amylovora* strains by Amplified Fragment Length Polymorphism. *J. Appl. Microbiol.* 96, 302-310.
- Ritt, J.F., Guilloux-Benatier, M., Guzzo, J., Alexandre, H. y Remize, F.** 2008. Oligopeptides assimilation and transport by *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* 104 (2), 573-580.
- Ritt, J.F., Remize, F., Grandvalet, C., Guzzo, J., Atlan, D. y Alexandre, H.** 2009. Peptidases specific for proline-containing peptides and their unusual peptide-dependent regulation in *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* 106 (3), 801-813.
- Rivas, B., Marcobal, A., Carrascosa, A. y Muñoz, R.** 2006. PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. *J. Food Prot.* 69, 336-341.
- Rizzo, A.F., Korkeala, H. y Mononen, I.** 1987. Gas chromatography analysis of cellular fatty acids and neutral monosaccharides in the identification of lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2883-2888.
- Robinson, J.** 2006. The Oxford Companion to Wine. Third Edition Oxford University Press, pp. 576.
- Rodas, A.M., Chenoll, E., Macian, M.C., Ferrer, S., Pardo, I. y Aznar, R.** 2006. *Lactobacillus vini* sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 513-517.

- Rodas, A.M., Ferrer, S. y Pardo, I.** 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 412-422.
- Rodas, A.M., Ferrer, S. y Pardo, I.** 2005. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 197-207.
- Rodtong, S. y Tannock, G.W.** 1993. Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3480-3484.
- Rogosa, M., Mitchell, J.A. y Wiseman, R.F.** 1951. A selective medium for the isolation of oral and fecal lactobacilli. *J. Bacteriol.* 62, 132-133.
- Rojo-Bezares, B., Saenz, Y., Navarro, L., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F. y Torres, C.** 2007a. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food Microbiol.* 24, 482-491.
- Rojo-Bezares, B., Saenz, Y., Zarazaga, M., Torres, C. y Ruiz-Larrea, F.** 2007b. Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 32-36.
- Rollan, G.C., Farias, M.E., Strasser de Saad, A.M. y Manca de Nadra, M.C.** 1998. Exoprotease activity of *Leuconostoc oenos* in stress conditions. *J. Appl. Microbiol.* 85, 219-223.
- Salazar, N., Prieto, A., Leal, J.A., Mayo, B., Bada-Gancedo, J.C., de los Reyes-Gavilán, C.G. y Ruas-Madiedo, P.** 2009. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. *J. Dairy Sci.* 92 (9), 4158-4168.
- Salminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y. y Gorbach, S.L.** 1998. Lactic acid bacteria in health and disease. En: Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects. Salminen, S. y Von Wright, A. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, USA. 2nd Edition, pp. 211-253.
- Samelis, J., Maurogenakis, F. y Metaxopoulos, J.** 1994. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 179-196.
- Sánchez, I., Seseña, S. y Palop, LI.** 2003. Identification of lactic acid bacteria from spontaneous fermentation of "Almagro" eggplants by SDS-PAGE whole cell protein fingerprinting. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 181-189.

- Sánchez, I., Seseña, S. y Palop, LI.** 2004. Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with “Almagro” eggplants spontaneous fermentation, based on combined numerical analysis of Randomly Amplified Polymorphic DNA and Pulsed- Field Gel Electrophoresis patterns. *J. Appl. Microbiol.* 97 (2), 446-458.
- Satokari, R.M., Vaughan, E.E., Smidt, H., Saarela, M., Mättö, J. y de Vos, W.M.** 2003. Molecular Approaches for the Detection and Identification of *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* in the Human Gastrointestinal Tract. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 572-584.
- Schillinger, U.** 1990. Bacteriocins of lactic acid bacteria. En: Biotechnology and Food Safety. Bills, D.D. y Kung, S. (Eds.), Butterworth-Heinemann, Stoneham, Massachussets, pp. 55-74.
- Schleifer, K.H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W. y Amann, R.** 1995. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 5, 1081- 1094.
- Schmidt, R.J., Emara, M.G. y Kung, L.** 2008. The use of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay for identification and enumeration of *Lactobacillus buchneri* in silage. *J. Appl. Microbiol.* 105 (3), 920-929.
- Schwartz, D.C. y Cantor, C.R.** 1984. Separation of yeast chormosome-sized DNA by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.
- Seng, P., Drancourt, M., Gourié, F., La Scola, B., Fournier, P.E., Rolain, J.M. y Raoult, D.** 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 49 (4), 543-551.
- Seseña, S., Sánchez, I. y Palop, M.LI.** 2005. Characterization of *Lactobacillus* strains and monitoring by RAPD-PCR in controlled fermentations of “Almagro” eggplants. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 325-335.
- Shalaby, A.R.** 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* 29, 675-690.
- Sharpe, M.E.** 1979. Identification of the lactic acid bacteria. En: Identification methods for microbiologists. Soc. Appl. Bacteriol. Techn. Series, no. 14. Skinner, L. y Lovelock, D.W. (Eds.), Academic Press, London. 2nd edition, pp. 233-259.

- Shinohara, T. Kudobera, S. y Yanagida, F.** 2000. Distribution of phenolic yeast and production of phenolic off-flavours in wine fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 90, 90-97.
- Silla Santos, M.H.** 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 213-231.
- Solieri, L., Genova, F., De Paola, M. y Giudici, P.** 2010. Characterization and technological properties of *Oenococcus oeni* strains from wine spontaneous malolactic fermentations: a framework for selection of new starter cultures. *J. Appl. Microbiol.* 108 (1), 285-298.
- Sozzi, T., Gnaegi, F., D'Amico, N. y Hose, H.** 1982. Difficultés de fermentation malolactique du vin dues à des bactériophages de *Leuconostoc oenos*. *Rev. Suisse Vit. Arb. Hort.* 14, 17-23.
- Sozzi, T., Maret, R. y Poulin, J.M.** 1976. Mise en evidence de bactériophages dans le vin. *Experimenta.* 32, 568-569.
- Spettoli, P., Nuti, M.P. y Zamora, A.** 1984. Properties of malolactic activity purified from *Leuconostoc oenos* ML34 by affinity chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 900-903.
- Stead, D.** 1993. The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 135-141.
- Stiles, E.S. y Holzapfel, W.H.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1-29.
- Strasser de Saad, A.M., y Manca de Nadra.** 1993. Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 406-410.
- Stratton, J., Hutkins, R.W. y Taylor, S.L.** 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: A review. *J. Food Protect.* 54, 460-470.
- Suárez, J.A.** 2008. Microbiología Enológica: Fundamentos de vinificación (3ª. Ed.). Mundi-Prensa (Ed.), Madrid.
- Suárez, J.A. e Íñigo, B.** 1990. Microbiología Enológica: Fundamentos de vinificación. Mundi-Prensa (Ed.), Madrid.
- Suárez, J.A. e Íñigo, B.** 2004. Microbiología Enológica: Fundamentos de vinificación. Mundi-Prensa (Ed.), Madrid.

- Taylor, S. L.** 1985. Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods. Monograph, World Health Organization. pp. 1-47.
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J. y Huis in't Veld, J.H.J.** 1990. Occurrence and formation of biologically amines in food. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 73-84.
- Tenorio, C., López, R., Sota, C., Garito, P. y Santamaría, P.** 2004. Efecto del momento de la inoculación de bacterias lácticas en la fermentación maloláctica. Abstract del IV Foro Mundial del Vino. Rioja III Milenio (Logroño).
- Thomas, T.D. y Mills, O.E.** 1981. Proteolytic enzymes of starter bacteria. *Neth. Milk Dairy J.* 35, 255-273.
- Tracie, L.W., Andrzejewski, D., Lay, J.O. y Musser, S.M.** 2003. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14, 342-351.
- Ugliko, M., Genovese, A. y Moio, L.** 2003. Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5073-5078.
- Valmorri, S., Settanni, L., Suzzi, G., Gardini, F., Vernocchi, P. y Corsetti, A.** 2006. Application of a novel polyphasic approach to study the lactobacilli composition of sourdoughs from the Abruzzo region (central Italy). *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 343-349.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. y Swings, J.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60, 407-438.
- Van Vuuren, H.J.J. y Dicks, L.M.T.** 1993. *Leuconostoc oenos*: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 99-112.
- Vaquero, I., Marcobal, A. y Muñoz, R.** 2004. Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 199-204.
- Vivas, N., Lonvaud-Funel, A. y Glories, Y.** 1997. Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 14, 291-300.
- Ward, L.J., Heap, H.A. y Kelly, W.J.** 2004. Characterization of closely related lactococcal starter strains which show differing patterns of bacteriophage sensitivity. *J. Appl. Microbiol.* 96 (1), 144-148

- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C.R., Fleet, G.H. y Lee, T.H.** 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a Reviews. *Am. J. Enol. Vitic.* 36 (4), 302-313.
- Williams, J.G.K., Kubelic, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingei, S.V.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.
- Yurdugül, S. y Bozoglu, F.** 2002. Studies on an inhibitor produced by lactic acid bacteria of wines on the control of malolactic fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* 215, 38-41.
- Yurdugül, S. y Bozoglu, F.** 2008. Effects of a bacteriocinlike substance produced by *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* on spoilage strain *Lactobacillus fructivorans* and various pathogens. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43, 76-81.
- Zahradnik, R.T., Magnusson, I., Walker, C., McDonell, E., Hillman, C.H. y Hillman, J.D.** 2009. Preliminary assessment of safety and effectiveness in humans of ProBiora3, a probiotic mouthwash. *J. Appl. Microbiol.* 107 (2), 682-690.
- Zapparoli G., Reguant C., Bordons A., Torriani S. y Dellaglio F.** 2000. Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Curr. Microbiol.* 40, 351-355.
- Zapparoli, G., Torriani, S., Pesente, P. y Dellaglio, F.** 1998. Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Lett. Appl. Microbiol.* 27 (5), 243-246.
- Zavaleta, A.I., Martinez-Murcia, A.J. y Rodríguez-Valera, F.** 1997. Intraspecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting and sequence analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1261-1267.
- Zhang, Z.Y., Liu, C., Zhu, Y.Z., Zhong, Y., Zhu, Y.Q., Zheng, H.J., Zhao, G.P., Wang, S.Y. y Guo, X.K.** 2009. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* JDM1. *J. Bacteriol.* 191 (15), 5020-5021.